

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Gress

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Auswirkung des MEN1 Gens
auf den Apoptose Signalweg
in pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Nele Wagener aus Gießen

Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

11.05.2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Buchholz

Korreferent/in: Prof. Dr. med. Schumacher

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	5
1.1 Deutsche Zusammenfassung	5
1.2 Englische Zusammenfassung	6
2 Einleitung	6
2.1 MEN1- Gen	6
2.2 Protein Menin	8
2.3 Physiologische und pathologische Apoptose.....	8
2.3.1 Die Caspase Familie	9
2.3.2 Aktivierung des extrinsischen Apoptosesignalweges	10
2.3.3 Der intrinsische/mitochondriale Apoptosesignalweg	10
2.3.4 Einfluss von Menin auf die intrinsische Apoptose	12
2.3.5 Menin und FOXO1	13
2.3.6 Einfluss von Menin auf die extrinsische Apoptose	14
2.4 MEN1-assoziierte neuroendokrine Neoplasien des Pankreas.....	14
2.5 Fragestellung der Arbeit	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Staurosporin.....	16
3.1.1 Apoptoseinduktion.....	16
3.1.2 Hemmung der Proteinkinase-C	16
3.2 Verwendete Primer	17
3.2.1 Tumorsuppressorprotein TP53.....	17
3.2.2 CDK-Inhibitor 1, p21	17
3.3 Verwendete Zellen	18
3.3.1 Zellprofil: BON1.....	18
3.3.2 Zellprofil: QGP1	18
3.3.3 Zellprofil: HPSC 2.2	19
3.3.4 Zellprofil: MEF (Mäuseembryofibroblasten)	20
3.4 Verwendete Materialien	21
3.5 Zellkulturmethoden.....	24
3.5.1 Zellkulturmedien	25
3.5.2 Mediumwechsel	26
3.5.3 Passagieren.....	26
3.5.4 Zellzählung mittels Zählkammer nach Neubauer	27
3.5.5 Kryokonservierung.....	28
3.5.6 Auftauen von Zellen	28
3.6 Labormethoden.....	28
3.6.1 MEN1-siRNA Transfektion	29
3.6.2 Caspase-Glo-8 Assay/Caspase-Glo-3/7 Assay	30
3.6.3 RNA Methoden.....	32
3.6.4 RNA-Quantifizierung.....	32
3.6.5 Real Time Quantitative PCR.....	33
3.6.6 Aussaat und Kultivierung von 3D-Sphäroid-Kulturen	35
4 Ergebnisse	37
4.1 Genxpression von MEN1, CDKN1A und TP53	37
4.2 Messung der Caspasen-8- und -3/7 Aktivitäten.....	44

4.3 Monozelluläre Tumorsphäroide von MEF-Zellen.....	53
4.4 Monozelluläre Tumorsphäroide von MEF-Zellen unter Staurosporin Inkubation.....	57
5. Diskussion	61
5.1 MEN1, CDKN1A und TP53-Genexpression.....	61
5.2 BON1, HPSC 2.2, QGP1 und MEF Zellen Caspasenaktivität	63
5.3. Sphäroide.....	65
5.4 Schlussfolgerung und Ausblick.....	66
6 Literaturverzeichnis	68
7 Abbildungsverzeichnis	69
8 Tabellenverzeichnis	80
9 Abkürzungsverzeichnis.....	83
10 Anhang.....	88
10.1 Ehrenwörtliche Erklärung.....	88

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Die multiple endokrine Neoplasie Typ 1 (*MEN1*) ist eine seltene autosomal dominant vererbte Tumorerkrankung. Eine inaktivierende Keimbahnmutation des *MEN1*-Gens (Chromosom 11q13), welches als Tumorsuppressorgen fungiert, löst die Erkrankung aus. Patienten, die von *MEN1* betroffen sind, entwickeln neuroendokrine Tumore, hierbei stellen der primäre Hyperparathyreoidismus, Hypophysenadenome, sowie gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien die Hauptmanifestation dar. Einige Patienten können auch Bronchial- und Thymuskarzinoide entwickeln, sowie Adenome in der Nebenniere. Eine hohe Sterblichkeitsrate der *MEN1*-Patienten ist auf duodenopankreatische neuroendokrine Tumore und das Thymuskarzinoid zurückzuführen. Bisher gibt es keine Therapieansätze, um das Fortschreiten der Erkrankung aufzuhalten. Die genaue und komplette Funktion des *Menins* ist bis heute noch nicht vollständig aufgeschlüsselt. Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen, in wie weit *Menin* Einfluss auf den Apoptosesignalweg nimmt. Apoptose ist der programmierte Zelltod, der durch Caspase-8 auf dem extrinsischen Apoptosesignalweg eingeleitet und durch Aktivierung der Effektorcaspase 3/7 ausgeführt wird. Um dieser Fragestellung auf den Grund zu gehen, wurde nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin eine Caspase 8 und 3/7 Aktivitätsmessung in zwei humanen neuroendokrinen Zelllinien (BON1, QGP) durchgeführt. Zudem wurde eine Herunterregulation des *MEN1*-Gens in den Zelllinien durch Zugabe des Transfektionsreagens *MEN1*-siRNA vorgenommen. Neben den genannten Zelllinien wurde die Caspase-Aktivität in *MEN1*-Knockout Mäuseembryofibroblasten (MEF-Zellen) und in humanen Pankreassternzellen (HPSC-Zellen) untersucht. Nach Apoptoseinduktion konnte in den Zelllinien MEF und HPSC 2.2. gezeigt werden, dass die Expression von Caspase-8 und Caspase-3/7 zwischen *MEN1*-Wildtyp und *MEN1*-Knockdown bzw. Knockout einen signifikanten Unterschied aufzeigt. Ein weiterer Weg zur Apoptoseauslösung erfolgt durch *TP53* über die intrinsische Signalkaskade. Durch Real Time qPCR konnte gezeigt werden, dass ein intaktes *MEN1*-Allel die Genexpression von *TP53* und *p21* aufreguliert. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse daraufhin, dass *Menin* einen Einfluss auf den Apoptosesignalweg in humanen Zelllinien durch Aufregulation der Caspase-8 und -3/7 nimmt. Nach Ausschaltung des *Menins* scheint die Apoptose herunterreguliert zu sein. Diese Tatsache kann als neuer Therapieansatz bei *MEN1* Patienten genutzt werden.

1.2 Englische Zusammenfassung

Multiple endocrine neoplasia type 1 (*MEN1*) is a rare autosomal dominant disease, which is caused by a mutation of the tumor suppressor gene *MEN1* located at chromosome 11q13 by the Patients affected by *MEN1* develop neuroendocrine tumors, typically primary hyperparathyroidism, pituitary adenomas and gastro-enteropancreatic neuroendocrine neoplasia. Some patients may also develop bronchial and thymus carcinoids, as well as adenomas of the adrenal gland. A high mortality rate of *MEN1* patients is due to duodenopancreatic neuroendocrine tumors and the thymus carcinoids and, so far, there are no therapeutic approaches to stop the progression of the disease. The exact and complete function of the *menin* has not been fully elucidated yet. To date, there has been no study clarifying the role of *menin* in the apoptosis signal path. Apoptosis is a programmed cell death, initiated by caspase-8 and carried out by the executioner caspases 3/7. The caspase 8 and 3/7 activities measurement were carried out in the two neuroendocrine cell lines (BON1, QGP1), the human pancreatic stellate cells HPSC2.2 and the mouse embryo fibroblasts after induction of apoptosis mediated by the treatment with staurosporine. The *MEN1* gene was knocked down by *MEN1* siRNA. After induction of apoptosis, it could be shown that the activity was significantly down-regulated after *menin* was knocked down. Real-time qPCR was able to show that an intact *MEN1* allele upregulates the gene expression of *TP53* and *CDKN1A*. *MEN1* knockdown caused a down-regulation of the *TP53* and *CDKN1A* gene expression as well as a significant difference of the caspase-8 and 3/7 activity between *MEN1* wildtyp and knockdown/knockout. In summary, the results suggest that *menin* exerts an influence on the apoptosis signaling pathway. Knock-down/knock-out of *MEN1* interferes with the activity of caspases, thus disturbing the apoptotic process. These new insights could highlight new therapeutic approaches in the *MEN1* patients.

2 Einleitung

2.1 MEN1- Gen

Die multiple endokrine Neoplasie Typ 1, auch Wermer Syndrom genannt, wurde durch den Erstbeschreiber Wermer in 1954 als das kombinierte Vorliegen von multiplen Tumore [1]–[3] der Pankreasinseln (30-70%), Nebenschilddrüse (90%), Hypophyse (30-40%) oder Nebenniere (40%) charakterisiert [2], [4]. In 1997 wurde die Genetik des proteinkodierende *MEN1*-Gens durch positionelle Klonierung identifiziert [5]. Das *MEN1* Gen ist auf

Chromosom 11q13 lokalisiert, fungiert als Tumorsuppressorgen [6] und kodiert für das Protein *Menin*. Das 67kDa schwere Protein *Menin* [7] überspannt 9kb und 610 Aminosäuren [8], besteht aus 10 Exons. Es ist mit 37%-44% das am meisten mutierte Gen somatischer pNENs (pankreatische neuroendokrine Neoplasien) [6] und mit 6% das am meisten mutierte Gen genetischer pNENs [6]. Eine hohe Sterblichkeitsrate der *MEN1* Patienten ist auf die metastasierten Gastrinome, Thymuskarzinome und nicht-funktionelle Tumore zurückzuführen [9] [10]. Je nach **Tumortyp**, **Grading** und **Staging** erfolgt die Therapie in Form von Operation, Medikation und radiologischer Intervention [6]. *MEN1* assoziierte Tumore treten überwiegend im Alter von 5-81 Jahre, wobei das Hauptmanifestationsalter 20-30 Jahre beträgt [4], [11]. Das *MEN1*-Syndrom wird autosomal dominant vererbt [12], sodass die Nachkommen von *MEN1* erkrankten Elternteil zu 50% erben und erkranken [13]. *MEN1* Patienten entwickeln zu 80-100% nicht-funktionelle pankreatische neuroendokrine Neoplasien [14], 70-80% der Gastrinome sind zum Diagnosezeitpunkt maligne [15]. Die Prognose von nicht-funktionellen Neoplasien ist größenabhängig [16],[17],[18], [19]. *Menin*, ein Tumorsuppressorgen [20], dessen Funktion nach wie vor nicht komplett aufgeklärt ist, zeigt Apoptoseinduktion [21], Hemmung von Zellwachstum [22] durch epigenetische Modifizierung [6], hält den Zellzyklus an [23] und leitet DNA-Reparaturen ein [24]. Das Protein *Menin* zeigt eine umfangreiche funktionelle Verzweigung auf, die bei *MEN1*-Mutationen verloren gegangen sind [6]. Zu den Funktionen des pro-apoptotischen Proteins *Menins* zählen auch die Hemmung von anti-apoptotischen Wachstumssignalwegen in pNENs [6]. Bisherige Forschungserkenntnisse über den Einfluss von *Menin* auf den Apoptosesignalweg liegen von INS-1 Insulinomzellen aus Ratten und Mäuseembryofibroblastenzellen vor mit der Erkenntnis, dass *Menin* eine Aufregulation von Caspase-8 sowie eine gesteigerte TP53-Acetylierung und p21-Aktivierung bewirkt [21], [25], [26].

Schnepp et al. zeigte auf, dass bei UV- und TNF α -induzierter Apoptose *Menin* mit einer Aufregulation der Genexpression der Procaspase-8 in MEF-Zellen einherging [21]. Crabtree et al. hat gezeigt, dass mischerbige *MEN1*^{+/-} Mäuse, die einen somatischen Verlust von *MEN1* aufwiesen, endokrine Tumore entwickelten, was dem menschlichen *MEN1* Syndrom ähnelt [27]. Betroffenen *MEN1* Patienten wird eine regelmäßige Vorsorge im Rahmen eines Screening-Programms empfohlen. Hierbei wird in der Literatur kontrovers diskutiert, ab welchem Alter die Vorsorge angeboten werden sollte. Die Empfehlungen reichen ab dem 5. Lebensjahr bis das bei asymptomatischen Kindern und Jugendlichen ein Screening erst ab dem 16. Lebensjahr ausreichend ist [4], [28].

2.2 Protein Menin

Das aus 610 Aminosäuren bestehende Gerüstprotein *Menin* [29] wird in jeder Zelle exprimiert [30] und interagiert mit mehr als 40 Proteinen [6]. Das im Zellkern befindliche Tumorsuppressorprotein stoppt Wachstumssignalwege im Zellkern und im Zytoplasma [6]. Ausfall von *Menin* verursacht Tumorentstehung [31]. Hinsichtlich der Interaktion von *Menin* und Apoptose gibt es in der Literatur einige mögliche Hinweise:

- Das proapoptotische *Menin* hemmt Zellproliferation [22].
- *Menin* aktiviert Tumorsuppressor 53 (*TP53*) durch Acetylierung zur Einleitung der intrinsischen Apoptose [25].
- *Menin* führt epigenetische Regulationen aus [32].
- *Menin* initiiert die extrinsische Apoptose durch Genexpression von Caspase 8 [21].
- *Menin* aktiviert über *FOXO1* direkt die Caspase-3, die Apoptose auslöst [33].
- *Menin* kontrolliert Transkriptionsregulation [34].
- *Menin* kontrolliert Zellzyklusregulation [23] und sorgt für DNA-Reparatur [35].
- *Menin* kann Genomstabilität induzieren [36], [37].

2.3 Physiologische und pathologische Apoptose

Apoptose ist ein natürliches Suizidprogramm der gesunden Zelle, zu Beseitigung entarteter, überflüssiger und gealterter Zellen, zur Zellzahlkontrolle, Gewebsgröße und Modellierung des Zentralen Nervensystems [38], [39]. Apoptose kommt aus dem Griechischen und bedeutet „abfallen“ [40], [38]. Carl Vogt war der Erstbeschreiber der Apoptose, er entdeckte in 1842 die Apoptose beim Studium an Kaulquappen [41]. Pro Sekunde werden einige Millionen Zellen [42] durch den programmierten Zelltod auf einem sauberen, entzündungsfreien Weg beseitigt [43], [44]. Apoptose ist genetisch festgelegt und kann induziert werden, wobei idealerweise ein Gleichgewicht zwischen Zelltod und Zellteilung bestehen soll [45]. Eine zu hohe oder zu niedrige Apoptoserate kann zu Krankheiten führen [45]. Bei einer zu hohen Apoptoserate kommt es zu einer Verringerung der Zellzahl, was zum Beispiel bei einer viral bedingten Hepatitis der Fall ist [46], [47]. Gegenteilig bei einer zu geringen Apoptoserate, kommt es zu einer Zellzahlerhöhung, dieses ist bei Tumoren der Fall [48]. Die apoptotische Zelle schrumpft, der Zellkern löst sich auf und wird durch Makrophagen verdaut [49], [50], [51].

2.3.1 Die Caspase Familie

Caspase steht für **c**ystein-**a**spartate **s**pecific **p**rotease [52] und umfasst verschieden Caspasen, die man in Initiator- und Effektorcaspasen unterteilt [53].

Zu den Initiatorcaspasen zählen Caspase-2, Caspase-8, Caspase-9, Caspase-10 und zu den Effektorcaspasen Caspase-3, Caspase-6, Caspase-7 [53]

Caspasen spielen eine Schlüsselrolle in der Initiation und Exekution des programmierten Zelltods [53]. Initiator- und Effektorcaspasen sind inaktive Pro-Enzyme bestehend aus einer Pro-Domäne (PRO), gefolgt von einer großen und einer kleinen Untereinheit, einer Todeseffektordomäne (DED) und einer Caspaserekrutierungsdomäne (CARD) [52], [53].

A) Zelltod-Initiatoren:

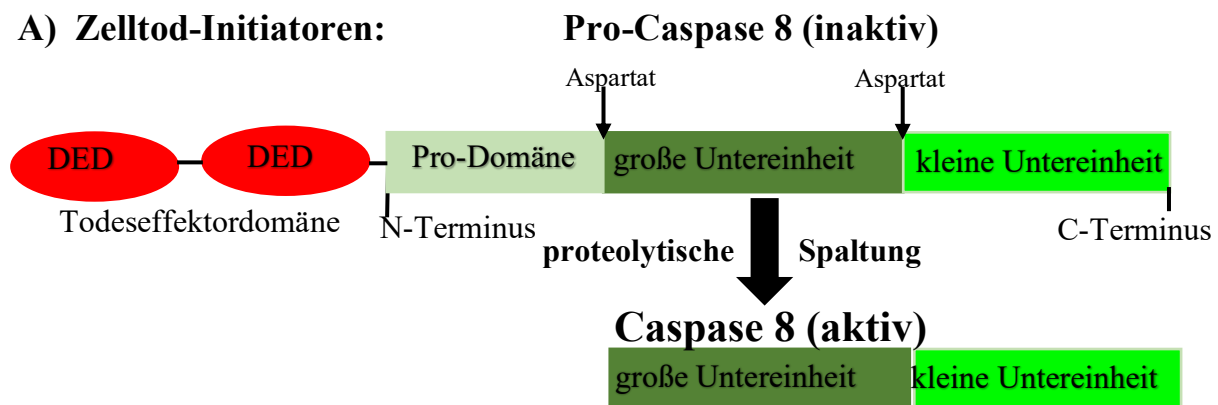


Abbildung 1: In A) Aufbau der in dieser Arbeit verwendeten inaktiven Procaspase 8 und deren Spaltung zur aktiven Caspase 8. Diese fungiert als Initiatorcaspase [53].

B) Zelltod-Effektoren:

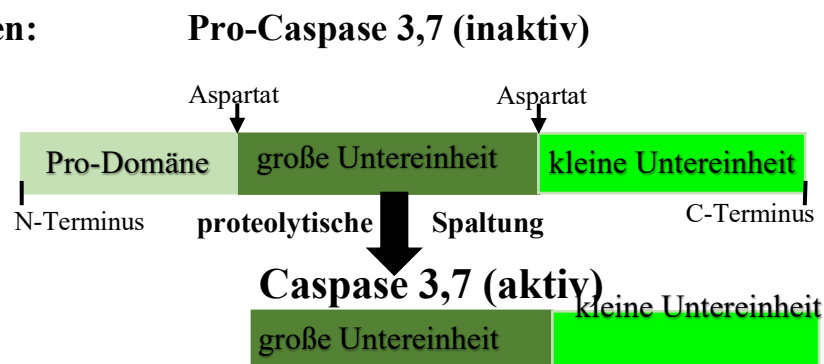


Abbildung 2: In B) Aufbau der in dieser Arbeit verwendeten inaktiven Procaspase-3 und -7, die nach erfolgter Spaltung als Effektorcaspasen fungieren [53].

Die Aktivierung der Pro-Enzyme durch proteolytische Spaltungen ist essentiell für die Auslösung der Apoptose [54]. Caspasen fungieren als Cysteinproteasen, die ihre Zielproteine C-terminal von Aspartat schneiden und damit aktivieren [54]. Initiator- und Effektorcaspasen führen über zwei Wege, nämlich der **intrinsischen** und der **extrinsischen** Signalkaskade zum

Zellzerfall [55]. Externe und interne Apoptosesignale mobilisieren die Initiatorcaspasen 2, 8, 9 und 10, welche die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 aktivieren [54]. Die Effektorcaspasen zerlegen die Zelle, indem sie den Zellkern, Plasmamembran und das Zytoplasma enzymatisch spalten [54].

2.3.2 Aktivierung des extrinsischen Apoptosesignalweges

Unter der extrinsischen Apoptose versteht man die durch extrazellulär rezeptorvermittelte Apoptose. Die extrinsische Apoptose kann durch die Rezeptoraktivierung von **Fas (cluster of differentiation 95 bzw. apoptosis antigen 1)**, **Tumornekrosefaktor** und **TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)** durch die Liganden **CD95 (cluster of differentiation 95)** [55]–[59], **TNF α (tumor necrosis factor alpha)** [60] induziert werden. Durch einen Apoptosestimulus werden die Initiatorcaspasen 2, 8, 9 und 10 rekrutiert und durch Aneinanderlagerung (Homodimerisierung) aktiviert [54]. Pro-Caspase-8 wird durch seine **DED (death effector domain)** mobilisiert [61]. Zusammen mit **FADD (Fas-associated protein with death domain)** bildet die Pro-Caspase 8 den **DISC (death inducing signaling complex)** [62]. Beim extrinsischen Apoptosesignalweg erfolgt die Freisetzung von aktiver Caspase 8 aus dem DISC-Komplex, die weitere Pro-Caspasen, u.a. die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 durch proteolytische Spaltung aktiviert [63].

TRADD (Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Typ-1-assoziiertes Todesdomänenprotein) bindet an den **TNF-R1** (Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1) [60]. Der TRADD/TNF-R1 Komplex aktiviert NF κ B, den JNK-Signalweg und den p38 MAPK-Signalweg [64]–[66]. TRADD mobilisiert FADD, das schließlich die Initiatorcaspase 8 aktiviert [61], [69]. Die Besonderheit der Transkriptionsfaktoren NF κ B, JNK und p38 MAPK ist, dass diese abhängig vom Apoptosestimulus pro- oder anti-apoptotisch fungieren können [70]–[76].

2.3.3 Der intrinsische/mitochondriale Apoptosesignalweg

Der intrinsische Apoptosesignalweg, auch mitochondrialer Signalweg genannt, wird durch intrinsische Apoptosestimuli ausgelöst. Zu den intrinsischen Apoptosestimuli zählen zum einen der Entzug von Wachstumssignalen, z.B. Interleukin-2, am Überlebensrezeptor [77]. Zum anderen können DNA-Schäden eine Konzentrationserhöhung des Tumorsuppressorproteins 53 (TP53) bewirken [78]. Ferner bewirkt das pro-apoptotische Menin eine Aktivierung von TP53 durch Acetylierung [79]. TP 53 löst einen intrazellulären Anstieg der apoptosefördernden Bcl Familienmitglieder, nämlich Bax, Bak und Bad aus [80].

Bax und Bad verursachen eine gesteigerte Durchlässigkeit der äußeren Mitochondrienmembran. Dies bewirkt einen Durchfluss von Zytocrom c aus dem Mitochondrium ins Zytosol [81]. Im Zytosol verbindet sich Zytocrom c mit APAF-1 (apoptotischer Protease- Aktivierungsfaktor-1) zum Apoptosom [81]. Das Apoptosom aktiviert die Initiator-Pro-Caspase 9 durch proteolytische Spaltung. Die aktive Caspase 9 spaltet die Pro-Caspase 3 zur aktiven Caspase 3 [81]. Die Verbindung zwischen der ex-und intrinsischen Signalkaskade wird durch die Initiatorcaspase 8 ermöglicht. Die Initiatorcaspase 8 ist Bestandteil des extrinsischen Signalwegs, welcher die intrinsische Signalkaskade durch

Spaltung von Bid in tBid (BH3 interacting domain death agonist) verstärkt [82], [83]. tBid unterstützt die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine aus dem Mitochondrium [82], [83]. Dies wird durch die Steigerung der Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran erreicht. Beide Wege führen über die gemeinsame Endstrecke durch die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 zum Zellzerfall in apoptotische Partikel (Blebbing) [84], welche rasch und entzündungsfrei von Makrophagen durch Phagozytose beseitigt werden [51].

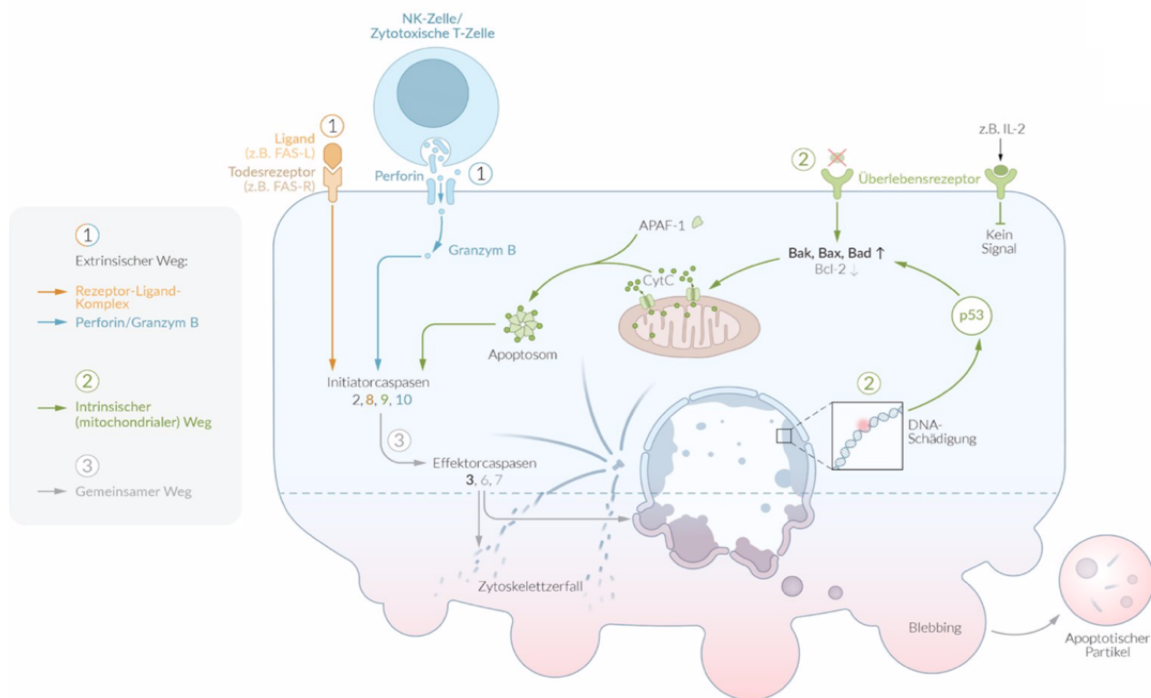


Abbildung 3: Zwei Wege führen zur Apoptose. Der Extrinsische Signalweg kann durch Staurosporin und durch den Rezeptor-Liganden Komplex in Form von TRAIL am TRAIL-Rezeptor, Fas am Fas-Rezeptor oder TNF am TNF-Rezeptor ausgelöst. Die Initiatorcaspasen 2, 8, 9 u. 10 aktivieren die Effektorcaspasen 3, 6 u. 7 der gemeinsamen Endstrecke. Der Intrinsische Signalweg kann durch DNA-Schäden oder Entzug von Wachstumssignalen ausgelöst werden. Bax, Bad und Bak bewirken die mitochondriale Cytochrom-c Freisetzung. Das Apoptosom, bestehend aus Cytochrom-C und APAF-1, aktiviert die Initiator-Pro-Caspase 9, welche die Effektorcaspasen 3, 6 u. 7 der gemeinsamen Endstrecke aktiviert [67].

2.3.4 Einfluss von Menin auf die intrinsische Apoptose

Menin aktiviert Tumorsuppressor 53 (TP53) durch Acetylierung und Phosphorylierung zur Einleitung der intrinsischen Apoptose. Bazzi et al. zufolge korreliert die Menin Expression in INS-1 Insulinoma Zellen mit einer gesteigerten Rate an acetyliertem TP53 [79]. Menin beeinflusst die Transkriptionsaktivität von **TP53**, indem **p21**, der CDK-Inhibitor 1, verstärkt hergestellt wird [85]. P21 hemmt den Übergang der G₁-Phase zur S-Phase [86]–[88]. Ein funktionell aktives Menin geht mit einer 8-fach erhöhten mRNA-Transkriptionsrate von p21 **innerhalb von 3 Stunden** nach DNA-Schädigung einher [25]. Menin aktiviert TP53 durch Acetylierung, welches die Synthese proapoptotischer Bcl-Mitglieder Bax, Bid, Noxa und Puma bewirkt [89]. Cytochrom c und Apaf-1 werden infolge einer gesteigerten Durchlässigkeit der Mitochondriummembran freigesetzt und bilden das Apoptosom, das die Initiator-Procaspase 9 aktiviert [90].

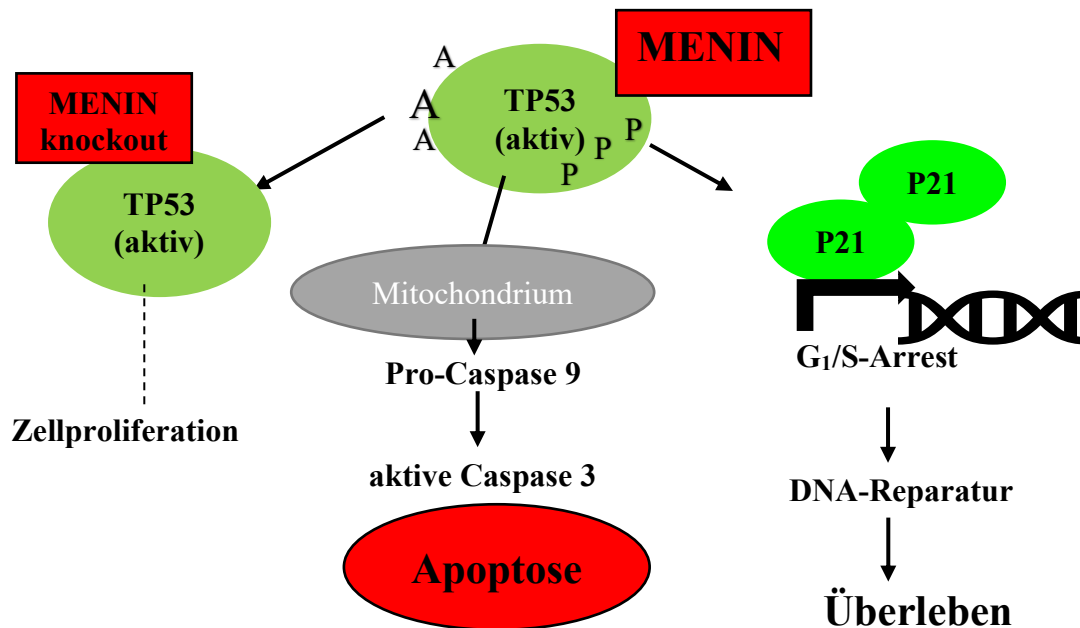


Abbildung 4: Wildtyp Menin initiiert die Phosphorylierung und Acetylierung von TP53, welches durch Aktivierung von p21 entweder Zellzyklusarrest in der G₁/S-Phase, DNA-Reparatur, Zellüberleben oder Apoptose bewirkt [79]. Apoptose wird durch TP53 mitochondrial (intrinsisch) durch Rekrutierung von Pro-Caspase 9 eingeleitet [126]. Caspase 9 aktiviert Caspase 3, welche die Apoptose auslöst [209]. Ein knockout Menins geht mit einer Apoptosereduktion einher [94].

2.3.5 Menin und FOXO1

Zongzhe et al. zeigte, dass Menin auf direktem Weg die Caspase 3 Aktivität steigert [91]. Dies erreicht Menin, indem es das proapoptotische FOXO1 Protein in INS-1 Zellen stabilisiert und vor dem Abbau durch die SCF-Skp2-Ubiquitinligase schützt [33]. Ferner verhindert Menin FOXO's Phosphorylierung durch Akt, was mit einer funktionellen Inaktivierung von FOXO einhergehen würde [33]. Dies führt zu einer gesteigerten Caspase 3 Aktivität [91]. Menin und der Transkriptionsfaktor FOXO1 steigern wechselseitig ihre Genexpression [91]. Allerdings bewirkt die Phosphorylierung FOXOs durch PI3/AKT/mTOR eine reduzierte Menin Expression, demzufolge Zellwachstum [92]. FOXO1 induziert Apoptose durch Genexpression von proapoptotischen Proteinen wie Bim [93] und steigert die Aktivität von Caspase 3 [91]. Zongzhe et al. zeigte, dass Menin die Spaltung von Pro-Caspase 3 zu aktiver Caspase 3 steigerte [91]. Eine Hemmung von FOXO1 ging mit einer reduzierten Spaltung von Pro zu aktiver Caspase 3 einher [91].

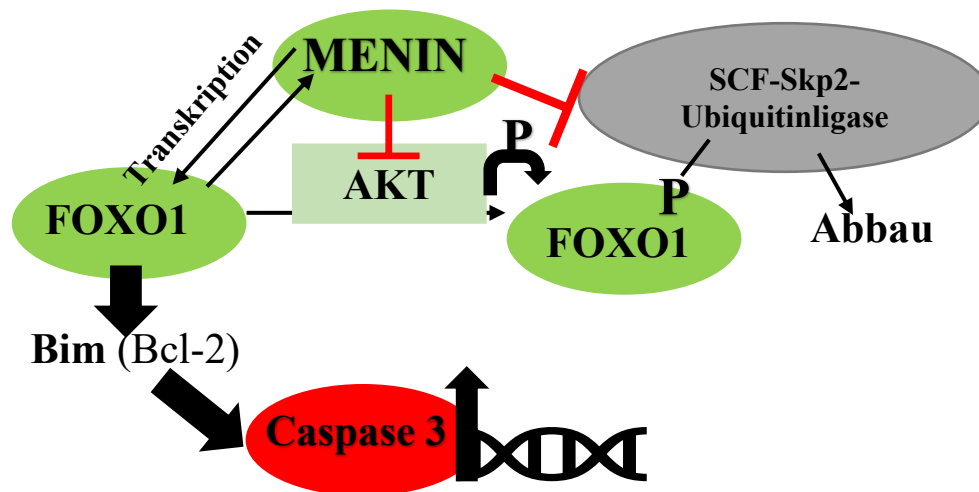


Abbildung 5: Menin aktiviert die Caspase 3-Aktivität durch den Transkriptionsfaktor FOXO1, der proapoptotische Bcl-Proteine aus dem Mitochondrium freilässt. Dies bewirkt eine hohe Caspase 3-Aktivität. Durch wechselseitige Gentranskription werden hohe Level an FOXO1 und Menin aufrecht erhalten. Zusätzlich bewahrt Menin FOXO1 vor dem Abbau durch Ubiquitinierung und Akt-initiierte Phosphorylierung [91].

2.3.6 Einfluss von Menin auf die extrinsische Apoptose

Caspase 8 stellt die Verbindung zwischen dem ex- und intrinsischem Apoptoseweg her [82]. Menin steigert Genexpression der Initiatorcaspase 8, indem es an den Lokus des Caspase 8 Gens bindet und per Genexpression eine Aufregulation der Caspase 8 bewirkt [26]. Durch Acetylierung der Histone H3 und H4 bewirkt Menin die Genexpression des Caspase 8 Gens [26]. Die TNF- Receptor induzierte Apoptose wird durch Menin unterstützt [26]. Es wurde gezeigt, dass ein Ausfall von MEN1 mit einer gesteigerten Resistenz der TNF α -induzierten Apoptose einhergeht [94]. **Eine Punktmutation des MEN1 Gens** verhindert das Anbinden von Menin an den Lokus des Caspase 8 Gens [26]. Demzufolge ist zu vermuten, dass mischerbige MEN1-Patienten keine Aufregulation der Pro-Caspase-8 durch Menin aufzeigen. Dies reduziert die Auslösung der extrinsischen Apoptose [26].

2.4 MEN1-assoziierte neuroendokrine Neoplasien des Pankreas

Ein Tumor ist eine gut- oder bösartige Neubildung (Neoplasie) von Gewebe, die durch unkontrollierte Zellteilung entstehen kann. Kennzeichnend für neuroendokrine Zellen ist die Hormonproduktion [95]. Die multiple endokrine Neoplasie, auch MEN1 genannt, ist assoziiert mit genetisch bedingten Tumoren des Pankreas, die gutartig- sowie auch bösartig und von niedrig bis hochgradiger Differenzierung sein können [96], [97]. Von 1000 Individuen sind 0,02- 0,2 vom **MEN1-Syndrom** betroffen [9]. Man unterscheidet nicht-funktionelle neuroendokrine Neoplasien von funktionellen Neoplasien, welche u.a. Gastrinome, Insulinome, Glukagonome, Somatostatinome und VIPome umfassen. **MEN1** Patienten entwickeln zu **80-100% nicht-funktionelle Tumore**, zu **54% Gastrinome**, zu **18% Insulinome** und zu **weniger als 3% Glukagonome, Somatostatinome, VIPome** [98]–[101]. Bis zu einem Alter von 50 Jahre ist die klinische Manifestation des MEN1 Syndroms zu 90% der Fälle bereits erfolgt [9]. Zu 98-100% liegen Nebenschilddrüsenadenome mit einer Nebenschilddrüsenüberfunktion sowie Hypophysenadenome zu 50-60% vor [14], [98], [99], [101].

2.5 Fragestellung der Arbeit

Trotz jahrzehnter langer Forschung ist die Funktion des MEN1 bzw. seines Proteins Menin bisher noch nicht vollständig verstanden. Es gibt einige Vorarbeiten, die sich mit Menin und Zellproliferation beschäftigen, jedoch gibt es weniger Arbeiten, die die Funktion des Menins in Bezug auf Apoptose näher beleuchten. Um die Überlebensrate bzw. Lebensqualität von betroffenen MEN1 Patienten weiterhin zu verbessern, wäre es von Interesse, herauszufinden, ob und welche Rolle Menin in der Apoptose spielt. Mit dieser Arbeit soll geklärt werden, welche Auswirkungen Menin auf die Apoptose hat. Hierzu wurde in Knockout-MEF, BON1, QGP1- und HPSC 2.2-Zellen ein MEN1 knockdown durchgeführt, um folgende Fragen zu klären:

- a) Hat der MEN1 Wildtyp Einfluss auf die Genexpression von TP53 und CDKN1A in humanen Tumorzelllinien und nicht-Tumorzelllinien?
- b) Welche Auswirkungen hat Staurosporin auf das MEN1-Gen?
- c) Welche Auswirkungen hat Staurosporin auf den MEN1-Knockdown?
- d) Beeinflusst der MEN1 Knockdown die Genexpression von TP53 und CDKN1A?
- e) Inwiefern beeinflusst TP53 die CDKN1A Genexpression?
- f) Inwiefern beeinflusst die Inkubationszeit von Staurosporin die Genexpressionen von MEN1, TP53 und CDKN1A?
- g) Welchen Einfluss hat der MEN1 Knock-down in humanen pankreatischen neuroendokrinen Tumorzellen hinsichtlich Apoptose?
- h) Welchen Einfluss hat MEN1 Knock-down auf den extrinsischen Signalweg der Apoptose?
- i) Hat der MEN1 Knock-down einen Einfluss auf apoptotische Mechanismen?

3 Material und Methoden

3.1 Staurosporin

3.1.1 Apoptoseinduktion

Staurosporin, ein Breitbandkinasemmer [102] aus der Gruppe der Indolcarbazine [103] ist ein natürliches Produkt, das vom Bakterium *Streptomyces staurosporeus* in 1977 aus einer japanischen Bodenprobe isoliert wurde [104]. Staurosporin induziert die Spaltung der Pro-Caspasen-3,-8,-9 und -2 [105]. Belmokhtar et al. zufolge kann Staurosporin sowohl caspaseunabhängig [106] Apoptose als auch Apoptose in chemotherapieresistenten Tumorzellen auslösen [107]. Der Apoptosestimulator Staurosporin fungiert als Goldstandard für eine sehr schnelle Apoptose [108] [109] durch Aktivierung der Pro-Caspase-3 innerhalb von 4h bis maximal 8-16h, die zu einer Zellfragmentierung nach 8h und maximal 16h bis 24h Inkubationszeit mit Staurosporin führt [108], [110]. Staurosporin induziert sowohl die intrinsische Apoptose, durch direkte Aktivierung der Pro-Caspase-9, sodass Staurosporin Apoptose in resistenten Tumorzellen, die eine Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 und Bcl-x aufweisen, auslösen kann [111]. Auch kann Staurosporin die intrinsische Apoptose durch Cytochrom c-Freisetzung mit Apoptosombildung auslösen, welche die Pro-Caspase-9 aktiviert [111]. Desweiteren löst Staurosporin die extrinsische Apoptose durch Aktivierung von Pro-Caspase-8 [112] aus. Staurosporin bewirkt einen erhöhten TNF-alpha Spiegel, welcher die Caspase-8 aktiviert [112]. Staurosporin induziert Apoptose in erster Linie durch Erhöhung der Caspase 3 Aktivität [113] [114]. Studien haben gezeigt, dass Staurosporin Derivate wie UNC-01 und CGP 41251 in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika wie Irinotecan und Cisplatin eine gesteigerte anti-Tumor Wirkung, spezifische Signalwegunterbindung bei akzeptabler Zelltoxizität [115] aufweisen. Das Staurosporinderivat UNC-01 verstärkt die Apoptose-Wirkung in Tumorzellen, die keine Tumorsuppressoraktivität von Tp53 aufweisen [116]. In dieser Arbeit fungierte **Staurosporin** u.a. als **extrinsischer/intrinsischer Apoptosestimulus**, der die Caspase-8 aktiviert [112].

3.1.2 Hemmung der Proteinkinase-C

Eine aktive Proteinkinase C (PKC) geht mit Zellwachstum einher, wohingegen eine niedrige PKC-Aktivität die Apoptose hervorruft [117]. Ein Abkömmling von Staurosporin, 7-Hydroxystaurosporin, fungiert u.a. als PKC-Hemmer und induziert Apoptose unabhängig

vom Tumorsuppressorprotein 53 [118]. Staurosporin ist ein kompetitiver Antagonist der ATP-Bindestelle von Protein-C-Kinasen und bindet an weitere Kinasen mit geringer Selektivität [119]. Staurosporin ist hochgradig zelltoxisch und wird wegen mangelnder Spezifität klinisch nicht angewendet [120].

3.2 Verwendete Primer

3.2.1 Primer Tumorsuppressorprotein 53

Das Tumorsuppressorprotein 53, auch „Wächter des Genoms“ genannt, [121] ist in 50% aller menschlichen Tumore mutiert [122]. *TP53* wurde 1973 von Albert B. DeLeo, David P. Lane und Arnold Levine [123] erstmals erwähnt. *TP53* als Tumorsuppressor ist für die Gentranskription von 500 Gene zuständig [122]. *TP53* häuft sich in der Zelle durch DNA-Schäden an und aktiviert eine gesteigerte Gentranskription der proapoptotischen Bcl-2-Mitglieder wie NOXA und PUMA [124] [125]. Dadurch induziert *TP53* die intrinsische Apoptose, indem es die Initiatorcaspase 9 aktiviert [126]. Ferner unterstützt *TP53* die Einleitung der Apoptose durch gesteigerte Gentranskription von FAS (APO-1, CD95) [127]. *TP53* stoppt den Zellzyklus durch Aufregulation von p21 infolge von DNA-Schadensreparaturmechanismen. Gemeinsamkeiten der beiden Tumorsuppressoren Menin und *TP53* sind, dass Menin *TP53* durch Phosphorylierung und Acetylierung aktiviert, sodass *p53* die intrinsische Apoptose auslöst und durch p21 den Zellzyklus anhält [79].

3.2.2 CDK-Inhibitor 1, p21

Der Tumorsuppressor CDK-Inhibitor 1, auch bekannt als p21, wird durch das Gen *CDKN1A* codiert und fungiert bei Überexpression als Hemmstoff von Cyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) der S-Phase im Zellzyklus [128], [129]. Es konnte in Studien nachgewiesen werden, dass P21 apoptosehemmende Wirkung aufweist [130]. Es fungiert sowohl als **Tumorsuppressor**, sowie als **Onkogen** [128]. **P21 kann P53-abhängig und unabhängig von P53** aktiviert werden [128], [131]. Neben dem Zellzyklus hemmt P21 apoptosefördernde Proteine wie Procaspase 3, Caspase 8 [132]–[134] und ASK1 [135]. Viele Studien konnten nachweisen, dass p21 häufig in menschlichen Tumoren hochreguliert ist [128]. Während DNA-Reparaturen stoppt p21 den Zellzyklus und wirkt somit apoptosehemmend. Danach kann p21 nach Aktivierung pro-apoptotischer Gene in *P53*-abhängiger- und unabhängiger Weise zur Apoptose veranlassen [130].

3.3 Verwendete Zellen

3.3.1 Zellprofil: BON1

Kategorie	humane pankreatische neuroendokrine Tumorzelllinie; <i>in vitro</i> Modell für pNENs [136].
Organismus	Homo sapiens, erwachsen, männlich [137].
Herkunft	Lymphknotenmetastase eines Serotonin produzierenden pNEN (Karzinoid) aus 1991 [138]; Forschungslabor (Universitätsklinikum Marburg)
Kulturform	adhärente Monolayer [139]
Morphologie	epithelartig, vieleckig, stapeln sich in Bereichen auf
Charakteristika	immortal, keine Kontakthemmung, unendlich proliferationsfähig, kein zelldichteabhängiges Wachstum, anspruchslöse Kulturbedingungen, autokrine Wachstumsstimulation durch Sekretion von 5-HT und IGF-1 [140] -nahezu triploider Karyotyp mit 63 Chromosomen [141] -57 proteinverändernde Rasterschubmutationen [141]
Verdopplungszeit (h)	eigene Beobachtung: 24h Literaturangabe: 36-38h [137]
Wachstums-signalwege:	-RAS-RAF-MEK-ERK: Protoonkogene, Tumorgenese [142] -PI3K-AKT-mTORC: mTOR Aufregulation, PTEN Herunterregulation, Akt Gen-Vervielfältigung [143][144] [145] -Wnt-β-catenin: Hochregulation [146][147] -Hedgehog: Hochregulation [148]

3.3.2 Zellprofil: QGP1

Kategorie	humane pankreatische neuroendokrine Tumorzelllinie [137]
Organismus	Homo sapiens, erwachsen, männlich
Herkunft	Isolation aus Pankreas-Somatostatinom eines 61-Jährigen in 1980 [149] [150] [151] Forschungslabor (Universitätsklinikum Marburg)
Kulturform	adhärente Monolayer
Morphologie	epithelartig [152] polygonal u. bläschenförmig

Charakteristika	-langsamwachsend, CEA- u. Somatostatin-produzierend [153][154] -nahezu tetraploider Karyotyp mit 90-92 Chromosomen [155] -56 proteinverändernde Rasterschubmutationen [141]
Verdopplungszeit (h)	eigene Beobachtung: 40 h Literaturangabe: 3,5 Tage [156]
Wachstumssignalwege	-KRAS-RAF-MEK-ERK: Protoonkogene, Tumorgenese [155] -PI3K-AKT-mTOR: mTOR Aufregulation, PTEN Herunterregulation, Akt Gen-Vervielfältigung [143] -Wnt-β-catenin: Aktivierung [157] [158] -MDM2: Hochregulation des Protoonkogens [159] -MDM4: Aktivität des Protoonkogens [159] -WIP1: Aktivität des Negativregulators von TP53 [160] -CDK4: Hochregulation [161]

3.3.3 Zellprofil: HPSC 2.2

Kategorie	Humane Pankreatische Sternzelle
Organismus	Homo sapiens
Herkunft	Forschungslabor (Universitätsklinikum Marburg)
Kulturform	adhärente Monolayer
Morphologie	zahlreichen astartigen Zytoplasmafortsätze, schlanke, lange, spindelförmige Zellen mit ovalem Zellkern [162]
Zelltyp	Fibroblast, Umwandlung zu Myofibroblasten [163]
Signalwege	-MAPK-ERK1/2: Proliferation/Migration, EZM-Produktion, α-sma Expression [164]. -PI3K: Proliferation/Migration, EZM-Produktion [164] -PKC: EZM-Produktion [164] -Indian Hedgehog: Migration [164] -JAK-STAT: Proliferation [164] -Rho-Kinase: Aktin-Zytoskelett, EZM-Produktion Stressfaserbildung, Migration, Proliferation [165] -Transkriptionsfaktoren (AP-1, NF-KB, Gli-1): Proliferation/Migration, Aktivierung, EZM-Produktion [164] PRARγ: α-sma Expression, Proliferation, Phagozytose [164]
Verdopplungszeit	eigene Beobachtung: 48h Literaturangabe: 42h [166]
Proliferationsindex (Ki-67)	22,2% [167]

3.3.4 Zellprofil: MEF (Mäuseembryofibroblasten)

Kategorie	Primärzellen aus Mäuseembryonen [168]
Organismus	Maus [168]
Herkunft	Isolation des Embryos einer 14 Tage trächtigen Maus [168] durch den Kooperationspartner Dr. Philippe Bertolino (Cancer Research Center of Lyon CRCL)
Kulturform	Adhärente Monolayer
Morphologie	Spindelförmig Zytoplasmaausläufer, langgestreckte Morphologie, klares Zytoplasma mit ovalem Zellkern [169]
Identifikation	-MEFs sind begrenzt lebensfähig [170] [171] -Primärzellen werden zur Erforschung von biologischen <i>in vivo</i> Bedingungen eingesetzt [172].
Zelltyp	Fibroblast
Charakteristika	-Primärkulturen sind wegen Zellalterung zeitlich begrenzt kultivierbar , da eine Abnahme der Zellteilungsrate nach 4-5 Zellpassagen eintritt [173] - seneszente Zellen flachen ab, entwickeln einen vergrößerten Zelleib und exprimieren β -Galaktosidase und CDKN2A, Marker für Zellseneszenz [174][175]und sterben schließlich ab, was eine begrenzte Zellkultivierung bedingt
Funktion	Funktionsverlust des Tumorsuppressors Menin ermöglicht Einblick in Tumorentstehung. Mit dem Ziel, die genaue Funktion von Menin zu erforschen, weisen MEN1-Knockout MEFs einen permanenten Knockout dieses Gens auf. MEFs werden zur Testung von Genfunktionen eingesetzt [176].
Signalwege	- PI3K/mTORC2/Akt in MEN1-Knockdown MEFs: Zellüberleben, Migration [177] - RAS/RAF/MEK/MAPK: Zellwachstum [178] - PI3-Kinase/Akt: Zellüberleben [179] - TAK1-Deletionen führen zu Apoptose in MEFs [180]
Verdopplungszeit	Eigene Beobachtung: 72h Literaturangabe: 45 ± 55h [181].

3.4 Verwendete Materialien

Tabelle 1: Geräte

Geräte	Hersteller
Analysewaage Explorer	OHAUS, Naenikon, CHE
Gefrierschrank (-20°C)	Bosch, Gerlingen, D
Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus, Hanau, D
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr, Biberach, D
Präzisionswaage 572	Kern & Sohn GmbH, Balingen, D
Autoklav	Biomedis, Gießen, D
Reinwasser Systeme, Arium Pro	Sartorius AG, Göttingen, D
Eismaschine	ZIEGRA, Isernhagen, D
Elektrophore-Netzteil, Power Pac 300	BioRad, München, D
Heizblock Dri-Block DB-3	Staffordshire, ST15 OSA, UK
Magnetrührer mit Heizung, MR 2002	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Kehlheim, D
Mikroskop	OLS OMNI Life, Basel, CH
Permanentmarker, Edding 3000	Edding AG, Ahrensburg, D
Permanentmarker, Edding 750	Edding AG, Ahrensburg, D
Spektrometer, NanoDrop	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, USA
Pipetten (2,5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 1000µl), Reference	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettierhilfe, PIPETBOY	INTEGRA Biosciences, Biebertal, D
Real- Time System, CFX96	BioRad, Hercules, U.S.A.
sterile Werkbank, Nunc 20229	Fisher Scientific, Langenselbold, D
Inkubator	Heraeus, Thermo Scientific, USA
Flex Cycler	analytic jena AG, Jena, D
Mikrozentrifuge, Eppendorf 5424R	Eppendorf, Hamburg, D
Mikroreaktionsgefäße 0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg, D
Vakuumzentrifuge, Speed Vac Concentrator	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, USA
Vortexmischer, REAX 1 DR	Heidolph, Kehlheim, D
Computer, Samsung Sync Master B1940	Samsung Electronics Co., Ltd
Zählkammer nach Neubauer	Carl Roth GmbH + Co. KG
Microplate Luminometer, Glomax 96	Promega, Fitchburg, U.S.A.
microplate reader, E max	Molecular Devices GmbH, München, D
xCelligence	ACEA Biosciences, Inc., San Diego, USA
Sprout Minizentrifuge	Biozym Scientific GmbH
Spektralphotometer, Nano Drop Lite	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Deckgläser (24 x 24mm)	Menzel, Braunschweig, D

Mikro-Schraubröhre (2ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Mikroreaktionsgefäße (0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Nitrozellulose Blotting Transfermembran Amersham™ Protran™	GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, USA
Pasteurglaspipetten (230mm)	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön, D
Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
PVDF Membrane Immun-Blot® (20x20cm)	Bio Rad, Hercules, USA
Röhren (15ml, 50ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Serologische Pipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Zellkulturflasche TC- Flasche T25 (25cm²) T75 (75cm²) T 175cm (175cm²)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Zellkulturplatte (96-, 6-well)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Handschuhe Nobaglove (puderfrei)	Nobamed Paul Danz AG, Wetter/ Ruhr, D
PCR-Folien Star Seal Advanced Polyolefin Film	STARLAB GmbH, Hamburg, D
96-Well-PCR-Platte, Non- Skirted, Low Profile, weiß	STARLAB GmbH, Hamburg, D

Tabelle 3: Gebrauchsfertige Kits

Kit	Inhalt	Hersteller
Rneasy Mini	Rneays Mini Spin Columns (50x) Collection Tubes (1,5ml, 2ml) RLT, RW1, RPE- Puffer Rnase freie Reagentien	Qiagen, Venlo, NLD
iScript cDNA Synthesis	Reverse Transkriptase Reaction Mix Rnase freies Wasser	Bio Rad, Hercules, USA
Go Taq qPCR Master Mix	Master Mix CXR Reference Dye Nuklease freies Wasser	Promega Corporation, Fitchburg, USA

Caspase-Glo® 8 Assay	10ml Caspase-Glo® 8 Puffer 1Fl. Caspase-Glo® 8 Substrate lyophil. 7.5µl MG-132Inhibitor	Promega Corporation, Fitchburg, U.S.A
Caspase-Glo® 3/7 Assay	10ml Caspase-Glo® 3/7 Puffer 1Fl. Caspase-Glo® 3/7 Substrate lyophil.	Promega Corporation, Fitchburg, U.S.A

Tabelle 4: Medien, Seren, Lösungen, Reagenzien

Art			Hersteller
Zellkulturmedium: Medium (DMEM)	1x Gibco	Dubelco's Modified Eagle	Life Technologies, Carlsbad, USA
Zellkulturmedium:	1x Gibco	RPMI 1640	Life Technologies, Carlsbad, USA
Pufferlösung: Buffered Saline (DPBS)	1x Gibco	Dulbeco's Phosphat	Life Technologies, Carlsbad, USA
Fetales Kälberserum:	1x Gibco	Fetal Bovine Serum (FBS)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Trypsin/EDTA- Lösung:	1x Gibco	0,5%	Life Technologies, Carlsbad, USA
Einfriermedium: 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) 15% Fetal Bovine Serum (FBS) 75% Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM)			Wak- Chemie Medical GmbH, Steinbach, D Life Technologies, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin-Lösung: 100x Gibco			Life Technologies, Carlsbad, USA
Transfektionsreagens:		HiPerFect	Qiagen, Venlo, NLD
small interfering RNA (siRNA): Hs_MEN1_4 Flexi Tube siRNA			Qiagen, Venlo, NLD

Tabelle 5: Chemikalien und Arzneimittel

Art	CAS-Nr.:	Reinheitsgrad	Hersteller
Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK lyophil.	187389-52-2	≥95%	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	67-68-5	≥99% (GC)	Sigma Aldrich Louis, USA
Ethanol	64-17-5		St.

Gentamicin	1403-66-3		Life Sciences USA	Carlsbad,
Methanol	67-56-1	≥99,8% (GC)		
Staurosporin lyophil.	62996-74-1	≥95% (HPLC)	Sigma Aldrich, Louis, USA	St.

Tabelle 6: PCR-Primer

Primername	Hersteller	5'-3'-Primersequenz
Hs_MEN1_1_SG	QIAGEN GmbH, Hilden, D	forward: CTACCACTGTCGCAACCGCAAT reverse: GGCTACTTCAAAGAACTCCTTG TA
GAPDH	QIAGEN GmbH, Hilden, D	forward: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG reverse: ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
CDKN1A (p21)	QIAGEN GmbH, Hilden, D	forward: AGGTGGACCTGGAGACTCTCAG reverse: TCCTCTTGGAGAAGATCAGCCG
TP53	QIAGEN GmbH, Hilden, D	forward: CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG reverse: TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC

Tabelle 7: Datenanalyse

Produkt	Hersteller
SOFTmax Pro 3.1.1	Molecular Devices Inc., Sunnyvale, USA
Bio Rad CFX-Manager v2.0	Bio Rad, Hercules, USA
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corp., Redmond, USA
Attune™ Cytometric Software v1.2	Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
Bio-1D Version v15.01	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, D
FlowJo v7.6.5	Tree Star Inc., Ashland, USA
RTCA v1.2.1	ACEA Biosciences Inc., San Diego, USA
Fusion FX	Vilber Lourmat, Collégien,

3.5 Zellkulturmethoden

Um physiologische Wachstumsbedingungen der Zellkulturen zu gewährleisten, befanden sich alle Zellkulturflaschen konstant innerhalb eines CO₂- Wassermantelbrutschrank

(Heraeus GmbH), der über eine konstante Temperatur von 37,5°C, eine 5%ige CO₂-Begasung und 95%ige Luftfeuchtigkeit verfügte. Die hohe Luftfeuchtigkeit verhinderte das Austrocknen der Kulturmedien, um Schwankungen der Osmolarität zu vermeiden. Die 5%ige CO₂-Zufuhr diente der Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Werts innerhalb der Kulturmedien.

3.5.1 Zellkulturmedien

Die verwendeten Kulturmedien verfügten über ein isotonisches Grundmedium aus Natriumhydrogencarbonat, zum Schutze vor pH-Schwankungen und anorganische Ionen wie Natrium, Kalium, Chlorid, Phosphat, Calcium und Magnesium. Ferner waren diese mit Aminosäuren, Vitaminen und Wachstumsstoffe versetzt. Um Zelladhärenz zu ermöglichen, zeichneten sich die Kulturmedien durch einen hohen Gehalt an Calcium und Magnesium aus. Diese wurden zusätzlich mit 10% fetalem Kälberserum (FBS) versetzt, um Hormone, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle für die schnell proliferierende Zellen zu liefern. Ferner wurden die Zellkulturmedien mit 1% Penicillin-Streptomycin und 0,5% Gentamicin versetzt.

Tabelle 8: Zelllinie/Nährmedien/Zusätze

Zelllinie	Nährmedium	Zusätze
BON1	1x Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	10% FBS 1% Penicillin-Streptomycin 0,5% Gentamicin
QGP	1x Gibco RPMI 1640	10% FBS 1% Penicillin-Streptomycin 0,5% Gentamicin
HPSC 2.2	1x Gibco Dulbecco's Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	10% FBS 1% Penicillin-Streptomycin 0,5% Gentamicin
MEF-MEN1 Knockdown	1x Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	10% FBS 1% Penicillin-Streptomycin 0,5% Gentamicin
MEF-MEN1 Knockdown	1x Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	10% FBS 1% Penicillin-Streptomycin 0,5% Gentamicin

3.5.2 Mediumwechsel

Ein Mediumwechsel wurde jeden zweiten Tag vorgenommen. Ein Farbwechsel des ursprünglich roten Kulturmediums nach gelb, war Indikator für einen sauren pH-Wert durch angefallene Stoffwechselmetabolite. Violette Verfärbung des Kulturmediums verwies auf eine CO₂ -Unterversorgung. Zunächst wurden die Kulturmedien Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), RPMI 1640 und Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (DPBS) im Warmwasserbad für 30 Minuten auf 37,5°C erwärmt. Vor Erreichen der Subkonfluenz, die sich durch eine 90%ige Bodenbedeckung durch Zellen auszeichnete, war ein Mediumwechsel ausreichend. Mithilfe steriler Messpipetten und elektrischer Pipettierhilfe wurden 4ml DPBS in eine 25cm² große Kulturflaschen pipettiert, 6ml DPBS in eine 75cm² Kulturflaschen pipettiert, und 10ml DPBS in eine 175cm² große Kulturflasche hinzugefügt. Mittels serologischer Pipetten und Pipettierhilfe wurden 25cm² große Kulturflaschen mit 5ml, 75cm² große Kulturflaschen mit 12ml, und 175cm² große Kulturflaschen mit 25ml frischem Nährmedium befüllt.

3.5.3 Passagieren

Bei 70-80%iger Zellkonfluenz wurde eine Subkultur in einer neuen Flasche angelegt. Primärkulturen (Mef^{WT}, Mef^{KO}) und nicht transformierte Zellen, wie Pankreassternzellen (HPSC 2.2), stellten bei Erreichen von 90%iger Konfluenz ihr Wachstum wegen Kontakthemmung und Selektionsdruck ein. Die Tumorzelllinien (BON1, QGP1) zeigten keine dichteabhängige Wachstumshemmung bei 90%iger Konfluenz. Wegen Nährstoffmangel, Zellmorphologie- und Eigenschaftsveränderung wurden alle verwendeten Zelllinien regelmäßig bei 80%iger Konfluenz subkultiviert. Zunächst erfolgte ein Erwärmen der Kulturmedien, die Trypsin-EDTA Lösung (0,05%) und DPBS im Warmwasserbad für 30 Minuten auf 37,5°C, um eine optimale enzymatische Aktivität des Trypsins zu erhalten. Die Trypsinierung mit einer 0,05%igen Trypsin-EDTA Lösung diente dem enzymatischen Ablösen der Zelloberfläche vom Flaschenboden. Damit Trypsin wirken konnte, musste der Flaschenboden mittels phosphatgepufferter Salzlösung ohne Magnesium und Calcium (DPBS) gewaschen werden. Mittels serologischer Messpipette und Pipettierhilfe wurden 4 ml DPBS in eine 25cm² große Kulturflaschen pipettiert, 6ml DPBS in eine 75cm² Kulturflaschen und 10ml DPBS in eine 175cm² große Kulturflasche pipettiert. In Abhängigkeit von der Flaschengröße wurden 1ml/2ml/5ml 0,05%iges Trypsin/EDTA in die

Kulturflasche gegeben und für 4-10 Minuten Einwirkungszeit in den Inkubator gestellt. DPBS und die Trypsinlösung pipettierte man an die der Wachstumsfläche gegenüberliegende Seitenwand, um eine mechanische Ablösung des Monolayers durch direkten Zellkontakt mit Trypsin und DPBS zu vermeiden. Sobald alle trypsinisierten Zellen unter dem Mikroskop vom Boden gelöst frei im Medium schwammen und eine kugelförmige Gestalt annahmen, wurde die Aktivität des Trypsins durch Hinzugabe von Kulturmedium abgestoppt. Dies erreichte man durch die Hinzugabe von serumhaltigen Kulturmedium in doppelter Menge des Trypsins (2ml/4ml/10ml). Noch immer anheftende Zellen wurden mithilfe einer sterilen Messpipette mit etwas Kulturmedium vom Flaschenboden gespült. Bei zu langer Einwirkungszeit der Trypsin/EDTA-Lösung bestand die Gefahr einer irreversiblen Zerstörung der Antigene auf der Zelloberfläche. Die Zellsuspension wurde für 10min bei 1000rpm zentrifugiert und mit einer definierten Menge des Kulturmediums resuspendiert. Mittels Zellzählung durch eine Zählkammer ermittelte man die Zellzahl. Es erfolgte nun die Verteilung der Zellen mit einer Dichte von 10^5 Zellen/ml auf die neuen Kulturflaschen.

3.5.4 Zellzählung mittels Zählkammer nach Neubauer

Die Zählkammer nach Neubauer (Hämozytometer) ist eine 3 x 3 cm große, aus 4 Eckquadraten bestehende Glasplatte. Jedes Eckquadrat setzte sich aus 16 Kleinquadraten mit einer Fläche von jeweils 1mm^2 . Das Medium der Zellkulturflaschen wurde mithilfe einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt. Um Zellen der 75cm^2 Zellkulturflaschen zu waschen, wurden 6 ml PBS in die Flaschen hinzugefügt und anschließend leicht geschwenkt. Das PBS saugte man ab. Die Zellen wurden mittels Trypsin vom Boden gelöst und eine Zellpellet durch 10 minütige Zentrifugation bei 1000rpm bei 20°C hergestellt. Das entstandene Zellpellet wurde in 5ml Kulturmedium ausreichend suspendiert und durch Schütteln durchmischt, um Ungenauigkeiten bei der Zählung durch Zellhaufen mit hoher Zelldichte zu vermeiden. Es erfolgte ein Anfeuchten des Deckglases und dieses drückte man fest an den Außensteg der Zählkammer an. Anschließend erfolgte eine Zugabe von $10\mu\text{l}$ Zellsuspension in die Zählkamme. Dazu setzte man die Mikropipettenspitze zwischen Deckglas und Zählkammer auf und pipettierte $10\mu\text{l}$ Zellsuspension in den Zwischenspalt. Unter dem Mikroskop (10-fach Objektiv) wurde eine manuelle Zellzählung der äußeren 4 Quadranten nach folgendem Schema durchgeführt: Die Summe der 4 Eckquadrate (L) dividierte man durch 4, um einen Mittelwert zu erhalten. Der Mittelwert wurde mit dem konstanten Faktor 10^4 multipliziert, was der Zellanzahl/ml entsprach:

$$L_1 + L_2 + L_3 + L_4 = L_{\text{gesamt}}$$

$$L_{\text{gesamt}} : 4 = L_{\text{Mittelwert}}$$

$$L_{\text{Mittelwert}} \times 10^4 = \underline{\hspace{2cm}} \text{ Zellen/ml}$$

3.5.5 Kryokonservierung

Wurde eine Zelllinie für aktuelle Experimente nicht mehr gebraucht oder lag ein Überschuss an Zellen vor, kryokonservierte man diese zur langfristigen Aufbewahrung bei -80°C ein. Primärkulturen (z.B. MEFs) zeigten Zellseneszenz bereits nach wenigen Subkultivierungen, weshalb eine Kryokonservierung bei niedriger Passagenzahl vorteilhaft war. Die Kryokonservierung ging ohne Vitalitätsverlust der Zelle einher und erfolgte bei Zellen mit niedriger Passagenzahl, um diese ggf. gegen alte Zellen mit hoher Passagenzahl auszuwechseln. Die Zellen wurden trypsiniert, gezählt und auf Eis gestellt. Das Einfriermedium setzte sich zusammen aus 75% Nährmedium der jeweiligen Zelllinie, 15% Fetal Bovine Serum (FBS) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO). Das zellschädigende DMSO fungierte als Gefrierschutzmittel, um eine Eiskristallbildung zu unterbinden. Es wurden 10^6 Zellen pro Milliliter Einfriermedium in 2ml Kryoröhrchen überführt, auf Eis gelagert und zügig im Gefrierschrank bei -80°C verstaut.

3.5.6 Auftauen von Zellen

Das Auftauen von Zellen musste sehr zügig geschehen, da die kryokonservierten Zellen schnellstmöglich vom zellschädigenden DMSO getrennt werden mussten. Zunächst wurden die Kryoröhrchen in einem warmen Wasserbad bei $37,5^\circ\text{C}$ bis zum vollständigen Auftauen erwärmt. Anschließend erfolgte das Befüllen von 75cm^2 große Zellkulturflaschen mit 20ml Nährmedium. Die aufgetauten Zellen wurden in einer 50ml Röhre mit 10ml Kulturmedium für 10 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert, um das Medium mit toxischem DMSO vom Zellpellet zu trennen. Den Überstand saugte man vom Zellpellet mittels Einmal-Pasteurpipette durch die Vakuumpumpe ab. Das Zellpellet wurde nun mittels Messpipette in 5ml frischem Nährmedium suspendiert und in die 20ml gefüllten Kulturflaschen überführt.

3.6 Labormethoden

3.6.1 MEN1-siRNA Transfektion

RNA-Interferenz bezeichnet das Einbringen von doppelsträngiger Fremd-RNA in einer Zelle, um gezielt einen Genabschnitt mittels Gen-Knockdown stillzulegen.

Ziel des MEN1 Gen-Knockdown war die gezielte Herabregulierung des proteincodierenden MEN1 Gens, um dessen Genfunktion sowie die Rolle des Tumorsuppressorproteins Menin analysieren zu können. Die Auswirkungen des MEN1-Knockdowns wurden anschließend per real-time qPCR ausgewertet. Die Transfektion wurde mithilfe der MEN1-Flexi Tube siRNA (1nmol) von Qiagen, des HiPerFect® Transfection Reagent von Qiagen sowie der Negativkontrolle All Stars von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Herunterregulation des MEN1 Gens auf den Wert Null konnte in Vorversuchen durch die Auswahl einer geeigneten FlexiTube GeneSolution GS4221 für MEN1 in den Zelllinien BON1, QGP1 und HPSC 2.2. ermittelt werden.

Nachfolgend die von uns verwendete siRNA Flexi Tube:

Name

Hs_MEN1_2 FlexiTube siRNA: SI00630238

Official Name

multiple endocrine neoplasia I

Official Symbol

MEN1 [Human]

Species

Human (Homo sapiens)

Entrez Gene Id

4221

Detected Transcripts

NM_000244 (2785 bp),NM_130799 (2770 bp),NM_130800 (2748 bp),NM_130801 (2736 bp),NM_130802 (3172 bp),NM_130803 (3179 bp),NM_130804 (3051 bp)

Refseq I D

NM_000244,NM_130799,NM_130800,NM_130801,NM_130802,NM_130803,NM_130804

Current Target mRNAs

4221|NM_000244 // 4221|NM_130799 // 4221|NM_130800 // 4221|NM_130801 // 4221|NM_130802 // 4221|NM_130803 // 4221|NM_130804

Abbildung 6: Produktangaben zur verwendeten Hs_MEN1_2 FlexiTube siRNA GeneSolution GS4221 for MEN1 des Herstellers Qiagen [210].

All Stars ist eine unspezifische siRNA und repräsentiert negativ transfizierte Zellproben. Um die Transfektionseffizienz des MEN1-Knockdown zu kontrollieren, wurde routinemäßig eine Negativkontrolle in Form von AllStars Hs Cell Death Control siRNA verwendet. Somit konnte die AllStar-Genexpression mit der Genexpression der MEN1-Knock-down Proben verglichen werden. Zunächst wurden 100µl RNase-freies Wasser in das MEN-1 siRNA-Lyophilisat (1nmol) gegeben, um eine 10µM Lösung zu erhalten. Nach Abschluss der Transfektion musste die siRNA bei -20°C gelagert werden. Zu Beginn wurden 7ml der Zelllinie entsprechendes Nährmedium in T-25 Kultur-flaschen (25cm²) mittels steriler Messpipette überführt und die Kulturflaschen gekennzeichnet und ausgezählt. $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden mithilfe einer sterilen Messpipette in die T25 Kulturflasche pipettiert und für wenige Minuten im Inkubator bei 37,5°C zwischengelagert. In der Zwischenzeit erfolgte die Herstellung der beiden Reaktionsansätze MEN1-siRNA und der Negativkontrolle AllStar. Um eine 5nM Konzentration der siRNA zu erhalten, wurden 0,8µl MEN1-siRNA und 12µl des Transfektionsreagens HiPerFect in ein steriles Mikoreaktionsgefäß mit 100µl serumfreiem Medium pipettiert. Dieser erste Reaktionsansatz wurde per Vortexer gemischt. Die Negativkontrolle AllStars bestand aus 0,8µl AllStars-siRNA, 12µl des Transfektionsreagens HiPerFect. Dies wurde in ein Mikoreaktionsgefäß mit 100µl serumfreiem Medium pipettiert und per Vortexer gemischt. Die beiden Reaktionsansätze mussten für 5 Minuten bei Raumtemperatur (15- 25°C) inkubiert werden. Die siRNA wurde stufenweise in kreisförmiger Bewegung von zentral nach peripher mittels Mikropipette in die entsprechende T25 Kulturflasche gegeben.

3.6.2 Caspase-Glo-8 Assay/Caspase-Glo-3/7 Assay

Die Zellen wurden jeweils auf eine 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät und für 6, 24 und 48h mit dem Apoptoseinduktor Staurosporin, dem Caspase-Inhibitors zVAD behandelt und mit MEN1 siRNA und AllStar siRNA transfiziert. Die Lumineszenzmessung war direkt proportional zur Caspasenaktivität. Ziel beider Assays war es, das Ausmaß der Caspasenaktivität in Abhängigkeit von der Zelllinie, Inkubationszeit, Vorbehandlung durch Staurosporin/zVAD oder siRNA Transfektion zu quantifizieren. Am 1. Behandlungstag erfolgte die Aussaat der Zellen in die 96-Well-Zellkulturplatte und im Anschluss wurde eine MEN1 siRNA Transfektion der Zelllinien BON1, QGP1 und HPSC 2.2 vorgenommen. Nach Trypsinierung und Resuspension des Zellpellets in einer definierten Menge an Kulturmedium

wurde die Zellzahl ermittelt. Pro Vertiefung einer 96-Well-Zellkulturplatte säte man 100.000 Zellen aus. Pro Well wurden 200µl Kulturmedium benötigt. Die Gesamtzahl an Zellen wurde mit der entsprechenden Menge an Kulturmedium in eine Pipettierwanne überführt. Die Zelltrennung erfolgte durch mehrmaliges auf- und abpipettieren. Mithilfe einer Mehrkanalpipette wurden die Wells mit 200µl Zellsuspension befüllt. Sofort im Anschluss erfolgte die MEN1 siRNA Transfektion der Zelllinien BON1, QGP1 und HPSC 2.2 um ein Knockdown des MEN1 Gens zu erzielen. Ferner existierte eine Negativkontrolle in Form von der siRNA AllStars Hs Cell Death Control. Zur Herstellung von 5nM des MEN1 siRNA Reaktionsansatzes wurden 0,08µl MEN1 siRNA, 0,6µl HiPerFect und 5µl serumfreies Kulturmedium in eine Mikroreaktionsgefäß pipettiert und mittels Vortexer gemischt. Zu Herstellung von 5nM der Negativkontrolle AllStars, wurden 0,08µl AllStars siRNA, 0,6µl HiPerFect und 5µl serumfreies Kulturmedium in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert und durch Vortexen gemischt. Die 96-Well-Zellkulturplatten inkubierte man für 48 Stunden bei 37,5°C. Nach 48 Stunden erfolgte die Behandlung mit dem Apoptoseinduktor Staurosporin sowie dem Caspaseinhibitor zVAD. Das lyophilisierte zVAD wurde in 107µl DMSO gelöst, um eine 20mM Lösung zu erhalten. 30 Minuten vor der Staurosporin Behandlung pipettierte man 3µl zVAD (20mM) in die entsprechenden Wells (siehe Abb.1: Pipettierschema). Danach wurde der Apoptose-Induktor Staurosporin in den Konzentrationen 1µM (0,093µl) und 10µM (0,93µl), dem Pipettierschema entsprechend, in die jeweiligen Wells (siehe Tab.1: Pipettierschema) pipettiert. Pro Caspase-Glo 8 Assay und Caspase-Glo 3/7 Assay wurden drei Leerwerte NTC (No Template Control) vorgesehen, die weder mittels siRNA transfiziert noch mit Staurosporin behandelt wurden. Die Inkubationszeit betrug sechs Stunden bei 37,5°C. Nach 6 und 24 bzw. nach 18 und 48 Stunden wurde das Caspase-Glo® 8 und 3/7 Reagens hergestellt. Promega's Caspase 8 bzw. 3/7 Assay beinhalteten den Caspase-Glo® 8 Puffer bzw. den Caspase-Glo® 3/7 Puffer sowie das Caspase-Glo® 8 Substrat bzw. das Caspase-Glo® 3/7 Substrat. Zunächst wurden die 2,5ml des Caspase-Glo® 8 bzw. 3/7 Puffer mittels steriler Mikropipette in die Flaschen der Caspase-Glo® 8 bzw. 3/7 Substrate überführt und durch auf- und abpipettieren gemischt. Nach Ablauf der sechs Stunden pipettierte man 100µl des Caspase-Glo® 8 Reagens in die Wells A₁₋₆, B₁₋₆, C₁₋₃, D₁₋₃, E₁₋₃, F₁₋₃ und G₁₋₃ mittels Mikropipette. Ferner wurden nach sechs Stunden 100µl des Caspase-Glo® 3/7 Reagens in die Wells A₇₋₁₂, B₇₋₁₂, C₇₋₉, D₇₋₉, E₇₋₉, F₇₋₉ und G₇₋₉ pipettiert. Nach 35 minütiger Inkubationszeit wurden die Platten auf dem Laborschüttler bei 300-500 rpm für 30 Sekunden durchmischt. Nun erfolgte die Lumineszenzmessung der Caspase-Glo® Reagenzien mittels Promegas' Luminometer Microplate Multimode Reader GLOMAX 96.

3.6.3 RNA Methoden

RNA-Extraktion

Um die Genexpression eines spezifischen DNA-Abschnitts in einer Zelllinie aufzuweisen, musste zunächst der Träger der Erbinformation, die Ribonukleinsäure (RNA), isoliert werden. Für die RNA-Extraktion wurde das RNeasy Mini Kit des Herstellers Qiagen verwendet und nach Anleitung des RNeasy Mini Handbook vorgegangen. Die RNA wurde nach der Single Step Methode nach Chomczynski & Sacchi isoliert [182]. Folgende Schritte waren für die RNA-Extraktion notwendig:

a) Zellyse	<ul style="list-style-type: none">• Zellernte• Zentrifugation• Überstand absaugen• 2x DPBS-Puffer• RLT-Puffer
b) 3 Phasentrennung	<ul style="list-style-type: none">• Zelllysate Homogenisierung
c) RNA- Ausfällung	<ul style="list-style-type: none">• 70% Ethanol• auf- und abpipettieren
d) 3x RNA Waschung	<ul style="list-style-type: none">• RW1-Puffer• RPE-Puffer• RPE-Puffer
e) RNA Herauslösen	<ul style="list-style-type: none">• RNase freies Wasser

Abbildung 7: Schritte der RNA-Extraktion

3.6.4 RNA-Quantifizierung

Mittels Absorptionsspektrometrie bestimmte man die RNA Konzentration durch den Spektralphotometer Nanodrop ND-1000 bei den Wellenlängen von 260nm und 280nm. Zur Leerwertmessung wurde der Messarm geöffnet und 1µl RNase freies Wasser auf das Messfeld pipettiert und die Leerwertmessung auf der Digitalanzeige bestätigt. Anschließend wurde 1µl RNA pro Messprobe auf das Messfeld pipettiert. Dann wurde der Messarm geschlossen und eine RNA Spektralmessung auf der Digitalanzeige aktiviert. Dem Lambert-Beer-Gesetz zufolge wurde der RNA Gehalt pro Probe anhand der Menge des absorbierten Lichtes quantifiziert [183]. Bei einer maximalen Absorption von 280nm konnten Verunreinigen durch Proteine quantifiziert werden. Die Reinheit kontrollierte man durch den Quotienten aus OD_{260nm}/OD_{280nm} , dieser sollte 1,8 - 2,0 betragen.

3.6.5 Real Time Quantitative PCR

Methodencharakterisierung

Die PCR-Methode ermöglichte eine Aussage hinsichtlich Existenz, Aktivität der Zielgene, was einen Rückschluss über die Zellfunktion zuließ. Mittels PCR konnten qualitative und quantitative Genfunktionsuntersuchungen vorgenommen werden. Die DNA-Vervielfältigungsfunktion basierte auf dem Prinzip der klassischen Polymerasekettenreaktion nach Kary Mullis aus dem Jahr 1983 [184]. Die DNA-Quantifikationsfunktion in Echtzeit war auf den DNA-bindende Farbstoff SYBR Green zurückzuführen, dessen Fluoreszenz proportional zum vervielfältigten DNA-Gehalt pro Replikationszyklus war. Die qRT-PCR wurde mit dem Go Taq qPCR Master Mix von Promega nach Herstellerangaben durchgeführt.

Vorgehensweise

Das gebrauchsfähige Kit Go Taq qPCR Master Mix von Promega beinhaltete 5 x 1ml des Go Taq® qPCR Master Mix (2x), 100µl des CXR Reference Dye (30µM) sowie 10 x 13ml nukleasefreies Wasser. Zunächst wurde die cDNA, nukleasefreies Wasser, der Go Taq® qPCR Master Mix und die zu verwendenden Primer zum Auftauen auf Eis gelagert. Es wurde eine 96-Well-PCR-Platte, non-skirted mit Low Profile, in weiß zum Pipettieren verwendet. Pro Primer wurde ein Reaktionsansatz bestehend aus 10µl Go Taq® qPCR Master Mix, 6µl Nuklease-freies Wasser und 2µl Primer in ein Eppendorf Tube pipettiert und gevortext. Für jede cDNA Probe mussten zwei technische Replikate hergestellt werden. Die Replikate sollten technische Variabilität durch möglicherweise schlecht kalibrierte Pipetten oder schlechte Probenquantität kompensieren. Der Reaktionsansatz wurde mit der Anzahl verwendeter Wells plus zwei extra Wells, zum Ausgleich möglicher Pipettierfehler, multipliziert. Der Reaktionsansatz wurde gevortext. Im ersten Schritt wurden 18µl des qPCR Reaktionsansatzes in alle Wells pipettiert, und anschließend 2µl der jeweiligen cDNA-Probe in die entsprechend nummerierten Wells pipettiert. Um die Effizienz der PCR zu messen stellte man eine 5 stufige Verdünnungsreihe aus cDNA im Verhältnis von 1:2 auf Eis her. Die Kalibrator cDNA setzte sich aus 5µl cDNA und 5µl Nuklease-freies Wasser zusammen. Dies wurde in ein 0,5ml Mikroreaktionsgefäß pipettiert und gevortext. In die restlichen 4 Mikroreaktionsgefäße legte man jeweils 5µl nukleasefreies Wasser vor. Die Kalibrator cDNA wurde im Verhältnis 1:2 mit den restlichen vier Mikroreaktionsgefäße verdünnt,

sodass Verdünnungswerte von $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$ entstanden. Die Verdünnungsreihe wurde in zweifacher Ausfertigung pro Primer hergestellt. Außerdem fertigte man pro Primer zwei Non Template Controls (NTC) mit 2 μ l nukleasefreiem Wasser an. Nun musste die 96-Well-PCR-Platte mit einer PCR-Folie, Star Seal Advanced Polyolefin Film, undurchlässig abgeklebt werden. Die 96-Well-PCR-Platte wurde für 30 Sekunden bei 1000 rpm zentrifugiert, um alle Reagenzien auf den Boden des Wells zu befördern. Auf der Menüleiste des Thermocyclers CFX96 des Herstellers Bio Rad stellte man das Programm SYBR® ein. Anschließend erfolgten die 42 Zyklen andauernde PCR für 48 Minuten im Real-Time PCR Detection System.

Auswertung der qRT-PCR

Die statistische Auswertung der PCR erfolgte durch Software CFX Manager™ 1.6 des Herstellers Bio-Rad sowie Microsoft Excel.

Bio-Rad's Real Time PCR Analysis Software erstellte anhand der pipettierten PCR-Platte eine Baseline, Exponentialphase, Linearphase und Plateauphase. Die Software definierte die ersten 3-15 PCR-Zyklen als Baseline, bei der die Fluoreszenz noch nicht messbar war. In der Exponentialphase war die Vervielfältigung der DNA am effizientesten. Hier war die Fluoreszenz erstmals messbar. Die Anzahl der exponentiellen PCR Zyklen war abhängig von der Menge an Ausgangs-DNA. In der nächsten Phase des Graphen, Linearphase genannt, flachte sich die Vervielfältigungskurve der DNA, da pro DNA Ausgangsmaterial weniger als zwei PCR-Produkte entstanden. Mangels Primer war die Vervielfältigungseffizienz kleiner als 100%. Die Plateauphase war annähernd waagrecht, da keine DNA mehr vervielfältigt wurde. Zudem berechnete die Software für jede DNA-Probe einen Ct-Punkt, auf dem Graphen erkennbar als Schnittpunkt zwischen Schwellenwertlinie und DNA-Vervielfältigungskurve. Die Software ermittelte die Anzahl der bisherigen PCR-Zyklen und ordnete dieser Anzahl die entsprechende Menge an erzeugtem Fluoreszenzsignal zu.

Ermittlung der Effizienz durch Standardkurve

Um die Konzentrationen an DNA von unbekannten Proben zu ermitteln erstellte die Software pro Primer einer Standardkurve. Zur Erstellung einer Standardkurve benötigte die Software eine Verdünnungsreihe von $\frac{1}{2}$ bis $\frac{1}{32}$, sowie den Ct-Wert pro Probe um damit eine lineare Regressionsgerade zu erstellen. Die Software berechnete die lineare Regressionsgerade mithilfe der Formel $x = (Ct - b)/m$, somit konnte die Software die initiale DNA-Menge der

Proben berechnen. Die Steigung der Standardkurve gibt die Effizienz der PCR an. Eine 100%ige Effizienz ergab sich bei einer Steigung von -3,32, ein y-Achsenabschnitt von 33-37, ein Korrelationskoeffizient (r^2) von 1,0.

Relative Quantifizierung: Bei der Ergebnisanalyse mit der Software CFX Manager TM Software wurde eine Relative Quantifizierung mit der Standardkurve vorgenommen, wodurch die DNA-Menge einer nicht bekannten Probe mit einer bekannten Standardkurve verglichen wurde. Dies ermöglichte die Quantifizierung von kleinen Veränderungen der Geneexpression. Das Haushaltsgen Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) wurde zur relativen Quantifizierung mit den unbekannten cDNA Proben herangezogen, da es bei allen eingesetzten Zellen in gleichen Mengen aktiv war. Das Referenzgen fungierte als interne Kontrolle zur Normalisierung von Daten, indem Mengenunterschiede der cDNA korrigiert wurden [185]. Die unterschiedlichen Schwellenwertzyklen (C_t) zwischen Referenzgen und unbekannter Probe wurden ermittelt, die man als ΔC_p Methode bezeichnete [186], [187]. Für die relative Genexpressionsanalyse wurde die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode angewandt. Dabei wurden die C_t Werte von Ziel- und Referenzgen voneinander subtrahiert (ΔC_t). Die Differenz zwischen behandelten Proben und nicht behandelten Proben bzw. Wildtyp-Genotyp und MEN1 knockdown-Genotyp wurden ermittelt ($\Delta\Delta C_t$).

3.6.6 Aussaat und Kultivierung von 3D-Sphäroid-Kulturen

Die Kultivierung der monozellulärer Tumorsphäroide erfolgte analog zur Liquid-Overlay-Technik [188]. Zunächst erfolgte die Herstellung des 1,5%igen Agarosegels mittels Zugabe von 0,15g Agarose pro 10ml DMEM. Anschließend wurde das Agarose-gemisch bei 120° für 15 Minuten autoklaviert. Um eine vorzeitige Aushärtung des flüssigen Agarosegels zu vermeiden, wurde dieses in einem Warmwasserbad deponiert. Unter sterilen Bedingungen erfolgte nun die Beschichtung der Wells einer 96-Well-Platte mit 50µl 1,5%iger flüssiger Agarose. Die 96-Well Platten wurde luftdicht verschlossen und für 24h im Brutschrank bei 37,5°C belassen. 24h später erfolgte die Aussaat der Sphäroid-Zellkulturen. Dazu wurden definierte Zellzahlen an MEN1-Wildtyp MEFs und MEN1-Knockout MEFs aus den beiden Monolayer Zellkulturen durch Trypsinierung isoliert. Die Aussaat der MEF-Zellen erfolgte mittels Pipette, wobei zuvor die jeweiligen Zellzahlen pro Well mit 200µl des Standardmediums DMEM verdünnt wurden. Anschließend wurden die 96-Well-Platten luftdicht verschlossen und für 4-5 Tage auf einem Laborschüttler unter Zellkulturbedingungen im Brutschrank inkubiert. An jedem zweiten Tag wurde ein Mediumwechsel der 96 Wells vorgenommen.

Tabelle 9: Zellanzahl/Zelllinie der 3D-Sphäroid-Kulturen

Zelllinie	Zellen/well
MEN1-Wildtyp MEFs	500
MEN1-Wildtyp MEFs	1.000
MEN1-Wildtyp MEFs	3.000
MEN1-Wildtyp MEFs	5.000
MEN1-Wildtyp MEFs	7.000
MEN1-Wildtyp MEFs	10.000
MEN1-Knockout MEFs	500
MEN1-Knockout MEFs	1.000
MEN1-Knockout MEFs	3.000
MEN1-Knockout MEFs	5.000
MEN1-Knockout MEFs	7.000
MEN1-Knockout MEFs	10.000

Ermittlung der Sphäroidgröße

Ab Tag 4 der Sphäroidkultivierung erfolgte die Bestimmung des Sphäroiddurchmessers mittels des Axiovert Inversmikroskops der Firma Zeiss. Dazu wurde die Software AxioVision verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Genexpression von MEN1, CDKN1A und TP53

Mittels Real Time qPCR sollte das Verhalten der Gene MEN1, CDKN1A und TP53 während MEN1-Knockdown und Staurosporin-induzierter Apoptose in der Tumorzelllinie BON1 und QGP1 und in den Sternzellen HPSC 2.2. quantifiziert werden. Das Tumorsuppressorprotein 53 kann als Initiator der intrinsischen Apoptose fungieren und kann einen Zellzyklusstopp durch Aktivierung des Cyklin-abhängigen Kinaseinhibitors p21 bewirken [85]–[88]. Zunächst wurde die Transfektion mit MEN1-siRNA durchgeführt, um einen Knockdown des MEN1-Gens in den Proben zu erzielen. Nach 24-stündiger Transfektion sollte Apoptose durch die Zugabe von Staurosporin erzielt werden. Die erste PCR-Messung wurde nach 24h und die zweite PCR-Messung nach 48h Inkubationszeit mit Staurosporin durchgeführt. Die Genexpression von MEN1, CDKN1A und TP53 wurde in den vier Proben MEN1-Wildtyp (NTC), MEN1-Knockdown (siMEN1), MEN1 Wildtyp (NTC) + Staurosporin (1µM) und MEN1 Knockdown (siMEN1) + Staurosporin (1µM) gemessen. Es erfolgte die Darstellung der durchschnittlichen Genexpression standardisiert mit GAPDH und normalisiert gegen NTC.

BON1 24h Inkubation: Die Probe MEN1-Knockdown zeigte nach 24-stündiger Inkubationszeit eine signifikante Hochregulation der Gene *CDKN1A* und *TP53*, wohingegen das MEN1-Gen stabil war ($p < 0,05$) (Abb. 21).

In der Probe MEN1-Wildtyp + 1µM Staurosporin war nach 24-stündiger Inkubation eine signifikante Herunterregulation des MEN1- und CDKN1A-Gens zu verzeichnen ($p < 0,05$). Ferner war in dieser Probe das TP53-Gen signifikant herunterreguliert.

Die Probe MEN1-Knockdown + 1µM Staurosporin wies nach 24-stündiger Inkubation mit Staurosporin eine signifikante Herunterregulation des MEN1- und CDKN1A-Gens sowie eine signifikante Hochregulation von TP53 auf ($p < 0,05$). Die signifikanten Werte standen in Bezug zum Referenzgen GAPDH einer MEN1-Wildtyp Probe. Es bestand ein Unterschied hinsichtlich der MEN1-Genexpression innerhalb der Proben siMEN1+ Stau, NTC + Stau und siMEN1. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus siMEN1 und Staurosporin die niedrigste MEN1-Genexpression aufwies. Durch die Zugabe von Staurosporin konnte eine niedrigere MEN1 Genexpression als in der MEN1-Knockdown Probe erzielt werden.

Die höchste CDKN1A-Genexpression konnte in der Probe siMEN1 erzielt werden, welche eine signifikante Aufregulation der CDKN1A-Genexpression aufwies. In Relation dazu

zeigte die Probe NTC + Stau eine signifikante Herunterregulation des CDKN1A-Genexpression. Hinsichtlich der TP53-Genexpression bestand ein geringer Unterschied zwischen den Proben. Die Proben siMEN1 und siMEN1+ Stau zeigten eine positive Genexpression, wobei die Probe NTC + Stau eine negative Genexpression aufwies.

Schlussfolgernd ist die Aussage zu treffen, dass in der BON1 Zelllinie nach 24-stündiger Inkubationszeit der MEN1-Knockdown die höchsten Genexpressionen des MEN1, CDKN1A und TP53 Gens aufwies, wohingegen die mit Staurosporin behandelten Proben bzw. die Kombination aus Staurosporin und MEN1-siRNA die niedrigsten Genexpressionen aufwiesen.

BON1 48h Inkubation: Nach 48-stündiger Inkubationszeit zeigte die Probe MEN1-Knockdown eine signifikante Herunterregulation der Gene *MEN1*, *CDKN1A* und *TP53* auf (Abb. 21). Die Probe MEN1-Wildtyp + 1µM Staurosporin wies ebenfalls eine signifikante Herunterregulation der Gene *MEN1*, *CDKN1A* und *TP53* auf ($p < 0,05$). In der Probe MEN1-Knockdown + 1µM Staurosporin lag eine signifikante Herunterregulation des MEN1-, CDKN1A- und TP53-Gens vor. Verglichen mit den der Probe siMEN1 und NTC+ Stau wies die MEN1-Knockdown Probe + Stau die niedrigste MEN1 Genexpression auf. Hinsichtlich der CDKN1A Genexpression wies die Probe NTC+ Stauro eine signifikant niedrigere Genexpression als die Probe siMEN1 auf. Die TP53 Genexpression war in den Proben siMEN1, NTC+ Stauro und siMEN1+ Stauro signifikant herunterreguliert, wobei die Proben siMEN1 und NTC + Stauro annähernd identisch waren.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Proben NTC + Stauro und siMEN1 und Stauro die niedrigsten Genexpressionen von MEN1 und CDKN1A aufwiesen.

Vergleich von 24h und 48h Inkubationszeit: Mit zunehmender Inkubationszeit konnte die Fortsetzung der Reduktion der Genexpression aller Proben gezeigt werden. Analog zur 24-stündigen Staurosporin Inkubation zeigte auch nach 48h Inkubation die Probe siMEN1+Stauro die signifikant niedrigste Genexpression des MEN1-Gens. Auch die Probe NTC+Stauro zeigte nach 48h eine Fortsetzung der Reduktion der MEN1-Genexpression. Ebenso eine Fortsetzung der reduzierten Genexpression bei der Probe siMEN1 nach 48-stündiger Inkubation. Deutlich wurde, dass die Probe siMEN1, welche nicht mit Staurosporin behandelt wurde, sowohl nach 24h als auch nach 48h die stärksten Genexpressionen aufwies. Die stärksten Genexpressionen konnten bei allen Proben sowohl nach 24h und 48h Inkubation im TP53 Gen festgestellt werden.

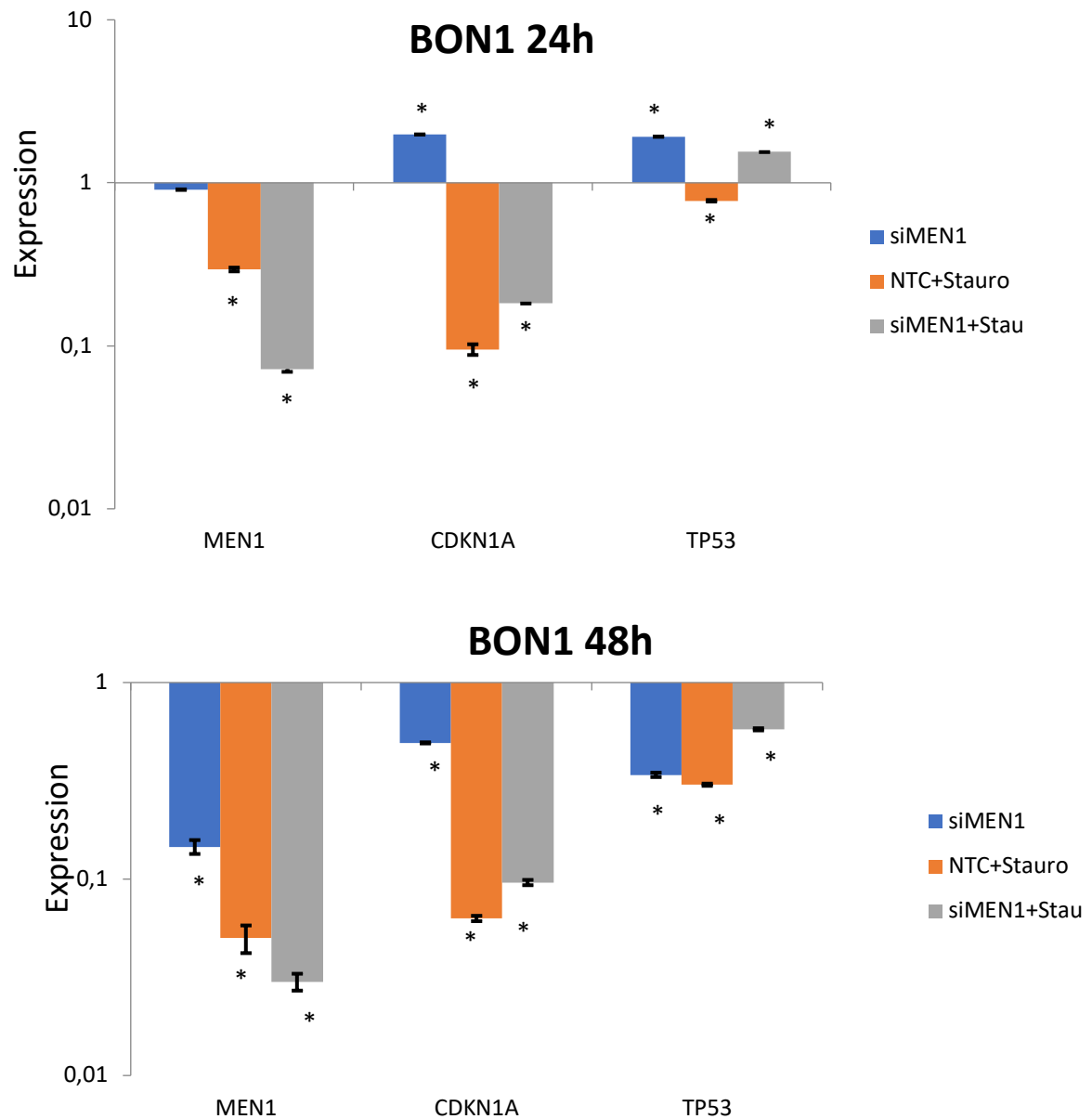


Abbildung 8: Real Time qPCR in BON1 Zellen zur Auswertung der relativen Genexpression des MEN1-, CDKN1A- (p21) und TP53-Gens nach 24- und 48-stündiger Inkubation mit bzw. ohne Staurosporin. Die Genexpressionen wurden jeweils auf GAPDH (relative Genexpression) der MEN1-Wildtyp Probe (NTC= no template control) normalisiert. Der MEN1 Knockdown erfolgte mit MEN1-siRNA. Die Balken zeigen die normalisierten Cq Werte \pm SEM. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p < 0,05$).

OGP1 24h Inkubation: Die Probe MEN1-Knockdown zeigte nach 24-stündiger Inkubation eine herunterregulierte Genexpression von *MEN1*, eine signifikante Herunterregulation von *CDKN1A* und von *TP53-Gens* (Abb. 23). In der Probe *MEN1*-Wildtyp + 1µM Staurosporin war nach 24-stündiger Inkubation eine signifikante Herunterregulation der Gene *MEN1* und *CDKN1A* feststellbar. Ferner wies diese Probe eine stabile Genexpression von *TP53* auf. Die Probe MEN1-Knockdown + Staurosporin zeigte eine signifikant herunterregulierte Genexpression von *CDKN1A* und *MEN1* auf, wohingegen die Expression von *TP53* stabil war. Die niedrigsten Genexpressionen der Gene *MEN1* und *CDKN1A* zeigten die Proben NTC+ Stauro und die Proben siMEN1 + Stauro. Die höchsten Genexpressionen von *MEN1* und *CDKN1A* zeigten die Proben siMEN1. Die stärkste Genexpression zeigte *TP53* in allen Proben.

OGP1 48h Inkubation: Nach 48-stündiger Inkubation wies die Probe MEN1-Knockdown eine signifikante Hochregulation des *MEN1* Gens auf (Abb. 23). Das Gen *CDKN1A* war herunterreguliert und das Gen *TP53* war signifikant herunterreguliert. Die Probe MEN1-Wildtyp + 1µM Staurosporin zeigte eine Herunterregulation des *MEN1*-Gens, eine signifikante Herunterregulation von *CDKN1A* sowie eine stabile Expression von *TP53* auf. Die Probe MEN1-Knockdown + 1µM Staurosporin zeigte eine signifikant herunterregulierte *MEN1* und *CDKN1A*-Genexpression, sowie eine signifikant hochregulierte *TP53*-Genexpression auf. Die höchste *MEN1*-Genexpression wurde von der Probe siMEN1 erzielt, und die niedrigste von der Probe siMEN1+ Stauro. NTC + Stauro und siMEN1 + Stauro zeigten die signifikant niedrigsten Genexpressionen von *CDKN1A* auf. Die stärkste Genexpression wies *TP53* in den Proben NTC+ Stauro sowie siMEN1+Stauro auf.

Vergleich von 24h und 48h Inkubationszeit: Zusammenfassend kann man die Aussage treffen, dass mit zunehmender Inkubationszeit eine Aufregulation des *MEN1* Gens erkennbar war, analog zur Zelllinie HPSC 2.2.. Die Proben NTC+ Stauro wiesen die niedrigsten *CDKN1A* Genexpressionen sowohl nach 24h als auch nach 48h auf. Die Ergebnisse zeigten, dass die MEN1-Knockdown Probe sowohl nach 24- als auch nach 48-stündiger Inkubation eine herunterregulierte Genexpression von *TP53* und *CDKN1A* (p21) aufwiesen. Nach Behandlung mit Staurosporin wies *TP53* eine stabile Expression auf (48h).

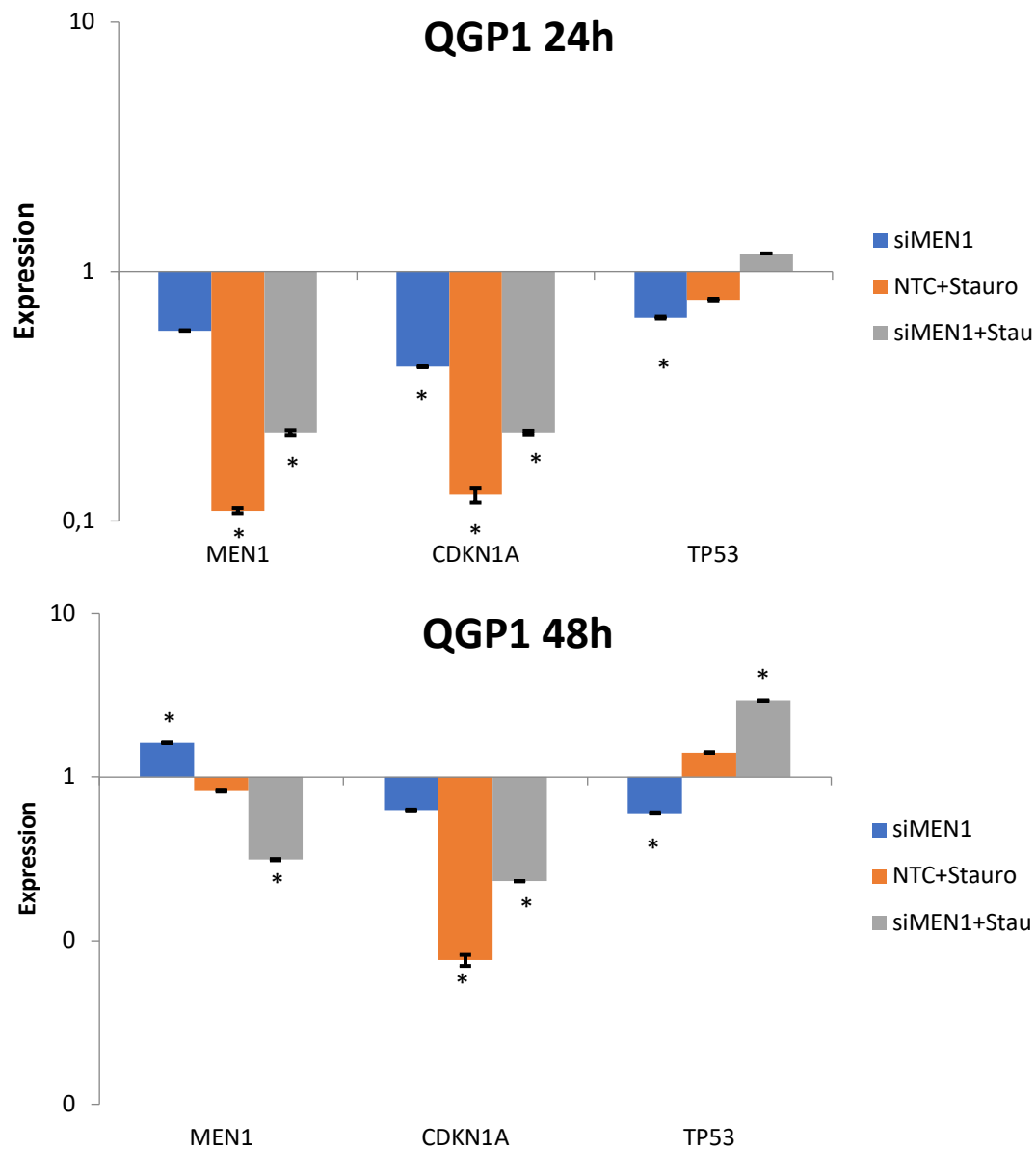


Abbildung 9: Real Time qPCR in BON1 Zellen zur Auswertung der relativen Genexpression des MEN1-, CDKN1A- (p21) und TP53-Gens nach 24- und 48-stündiger Inkubation mit bzw. ohne Staurosporin. Die Genexpressionen wurden jeweils auf GAPDH (relative Genexpression) der MEN1-Wildtyp Probe (NTC= no template control) normalisiert. Der MEN1 Knockdown erfolgte mit MEN1-siRNA. Die Balken zeigen die normalisierten Cq Werte \pm SEM. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p = < 0,05$).

HPSC 2.2 24h Inkubation: Die Proben MEN1-Knockdown, MEN1-Wildtyp + 1µM Staurosporin und MEN1-Knockdown + 1µM Staurosporin zeigten nach 24-stündiger Inkubationszeit eine signifikante Herunterregulation der Gene *MEN1*, *CDKN1A* und *TP53* auf (Abb. 22). Die signifikant niedrigste MEN1-Genexpression zeigte die Probe NTC + Stauro, wohingegen die Proben siMEN1 und siMEN1 + Stauro eine annähernd identisch signifikante Herunterregulation des MEN1 Gens aufwiesen. Die Probe siMEN1 + Stauro zeigte die niedrigste Genexpression von CDKN1A verglichen mit den Proben NTC + Stauro und siMEN1.

Ebenso zeigte die Probe siMEN1 + Stauro die signifikant niedrigste TP53 Genexpression. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die MEN1-Genexpression vergleichend zu TP53 und CDKN1A in allen Proben signifikant am niedrigsten war. Alle Proben wiesen eine signifikante Herunterregulation der Gene CDKN1A und TP53 auf. Durch Zugabe von Staurosporin war eine verstärkte Herunterregulation der Genexpressionen erkennbar.

HPSC 2.2 48h Inkubation: Nach 48-stündiger Inkubation wies die Probe MEN1-Knockdown eine signifikante Hochregulation auf, wobei *TP53* und *CDKN1A* eine signifikante Herunterregulation aufwiesen (Abb. 22). Die Probe MEN1-Wildtyp + 1µM Staurosporin wies eine signifikante Hochregulation des MEN1-Gens, sowie eine Herunterregulation der Gene CDKN1A und TP53 auf. Die Probe MEN1-Knockdown + 1µM Staurosporin zeigte eine stabile MEN1-Expression und eine Herunterregulation von CDKN1A und eine signifikante Herunterregulation von TP53 auf. Die höchsten Genexpressionen konnten in allen Proben im MEN1 festgestellt werden, währenddessen die CDKN1A Genexpression die niedrigste Genexpression aufzeigte. Eine signifikante Hochregulation des MEN1 Gens zeigte die Probe NTC + Stauro auf. Die niedrigste CDKN1A-Genexpression zeigte die Probe NTC+ Stauro, währenddessen die Probe MEN1-Knockdown die signifikant höchste Genexpression aufwies. Hinsichtlich der TP53 Genexpression wiesen alle Proben eine TP53 Herunterregulation auf, wobei die niedrigste Genexpression durch Probe NTC+ Stauro erreicht wurde.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass durch die Zugabe von Staurosporin die niedrigsten Genexpressionen von CDKN1A und TP53 vorlagen.

Vergleich von 24h und 48h Inkubationszeit: Mit zunehmender Inkubationszeit regenerierten sich die Genexpressionen der Gene MEN1, CDKN1A und TP53. Die mit Staurosporin behandelten Proben wiesen die niedrigste Genexpressionen von CDKN1A und TP53 auf.

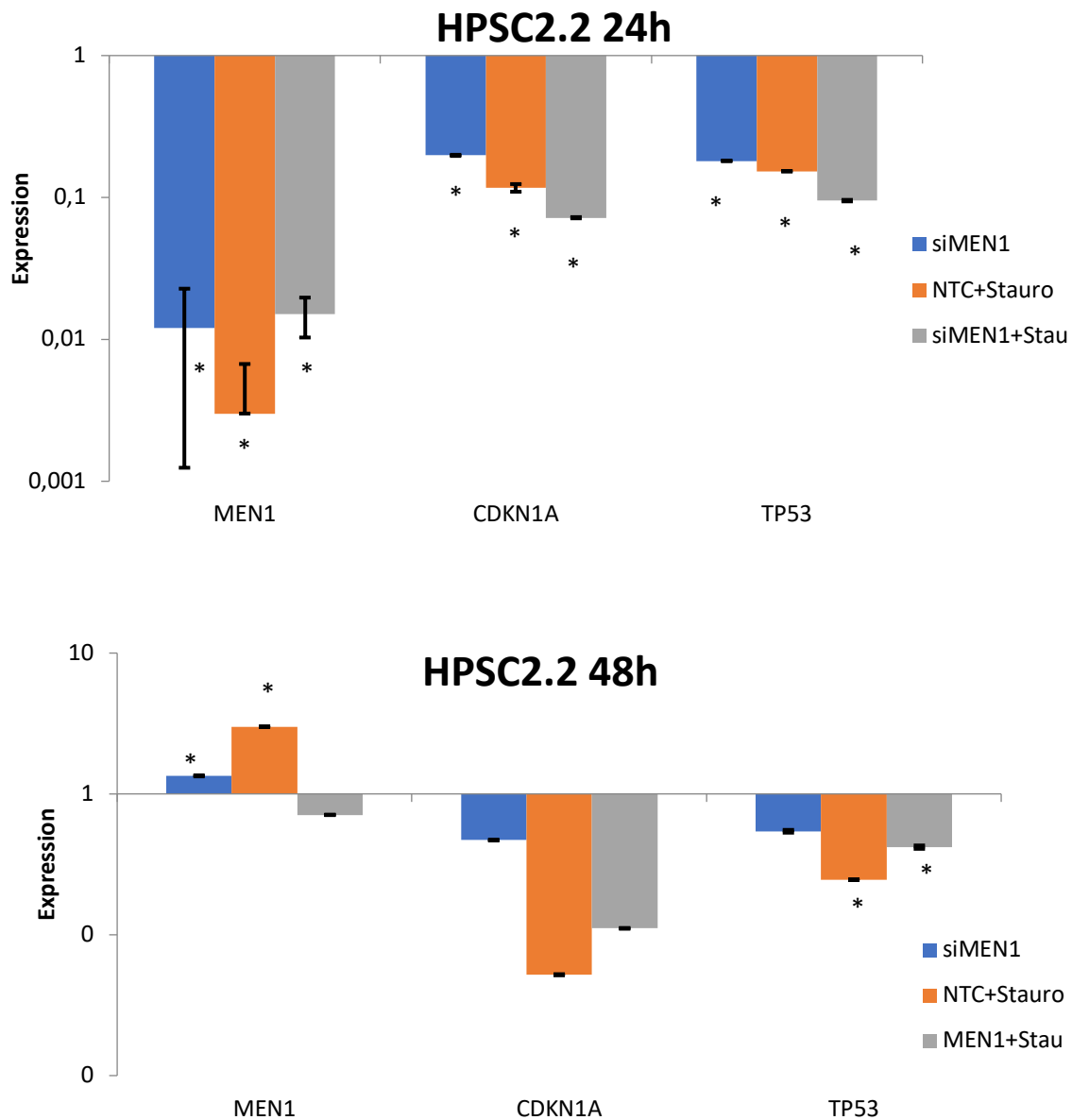


Abbildung 10: Real Time qPCR in BON1 Zellen zur Auswertung der relativen Genexpression des MEN1-, CDKN1A- (p21) und TP53-Gens nach 24- und 48-stündiger Inkubation mit bzw. ohne Staurosporin. Die Genexpressionen wurden jeweils auf GAPDH (relative Genexpression) der MEN1-Wildtyp Probe (NTC= no template control) normalisiert. Der MEN1 Knockdown erfolgte mit MEN1-siRNA. Die Balken zeigen die normalisierten Cq Werte \pm SEM. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p < 0,05$).

4.2 Messung der Caspasen-8- und -3/7 Aktivitäten

In diesem Versuch wurden MEF-Zellen verwendet, die aus 14 Tage alten Mäuseembryonen isoliert wurden. Die Zelleigenschaften und Zellsignalwege waren wenig abgewandelt und entsprachen nahezu den *in vivo* Eigenschaften bezüglich Zellsignalwege.

Mittels des Caspase-Glo® 8 Assay und Caspase-Glo3/7-Assay wurden die Aktivitäten der Initiatorcaspase 8 und der Effektorcaspasen 3/7 als Nachweis für Apoptose durch Lumineszenzmessung ermittelt. Als Initiatorcaspase leitet die Caspase-8 die extrinsische Apoptose ein und erreicht ihre maximale Aktivität zeitlich früher als die Effektorcaspase-3/7. Es erfolgte die Messung der Caspase-8 Aktivität nach 6- und 18- stündiger Staurosporin-Wirkung. Die Aktivität der Effektorcaspase-3/7 wurde nach 24- und 48- stündiger Staurosporin-Inkubation gemessen. Die Caspase-Aktivität wurde mittels des pan-Caspaseinhibitors zVAD blockiert. ZVAD wurde als Inhibitor des Staurosporineffekts verwendet. In allen Zelllinien wurden die Caspaseaktivität in den Proben unbehandelt, 1µM Staurosporin, zVAD und 1µM zVAD + Staurosporin ermittelt.

MEF-MEN1-Wildtyp vs. MEF-MEN1-Knockout-Zellen: 18h Inkubation

Nach 18-stündiger Behandlung mit 1µM Staurosporin wurde in den MEN1-Wildtyp MEFs eine signifikante Erhöhung der Caspase-8 Aktivität im Vergleich mit unbehandelten Zellen erzielt (Abb. 24). Die mit 1µM Staurosporin behandelten MEN1 Knockout MEFs zeigten eine annähernd gleich hohe Caspase-8 Aktivität wie die unbehandelten MEN1 Knockout MEFs. Die Caspase-8 Aktivität der MEN1-Knockout MEFs war signifikant niedriger im Vergleich zu den MEN1-Wildtyp MEF-Zellen nach Behandlung mit Staurosporin ($p < 0,05$). Die Probe MEN1-Wildtyp + zVAD zeigte nach 18-stündiger Inkubation eine signifikante Caspase-8 Aktivität. Die Probe MEN1-Knockout + zVAD sowie die Probe MEN1-Knockout + 1µM Staurosporin + zVAD wiesen eine geringfügige Caspase-8 Aktivität auf.

MEF-MEN1-Wildtyp-/MEF-MEN1-Knockout-Zellen: 48h Inkubation

Nach 48-stündiger Behandlung mit 1µM Staurosporin zeigte die MEN1-Wildtypprobe, eine im Vergleich mit der unbehandelten MEN1-Wildtypprobe, signifikante Hochregulation der Caspase-3/7 Aktivität auf (Abb. 25).

Die mit 1µM Staurosporin behandelte MEN1-Knockout Probe zeigte nach 48-stündiger Inkubation, analog zur unbehandelten MEN1-Knockout Probe, eine geringfügige Caspase-3/7 Aktivität auf.

In den mit 1µM Staurosporin behandelten und unbehandelten Proben MEN1-Wildtyp und MEN1-Knockout wurde durch den Caspaseinhibitor zVAD nach 48-stündiger Inkubation eine stark reduzierte Caspase-3/7 Aktivität bewirkt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die MEN1-Knockout Probe keine Caspase-8 Aktivität in den MEF-Zellen aufzeigt. Durch Zugabe von 1µM Staurosporin wurde in der MEN1-Wildtypprobe die höchste Caspase-8 Aktivität nach 18 Stunden erzielt. Die höchsten Caspasenaktivitäten 3/7 und -8 zeigten sich in den MEN1-Wildtypproben.

18h Inkubation

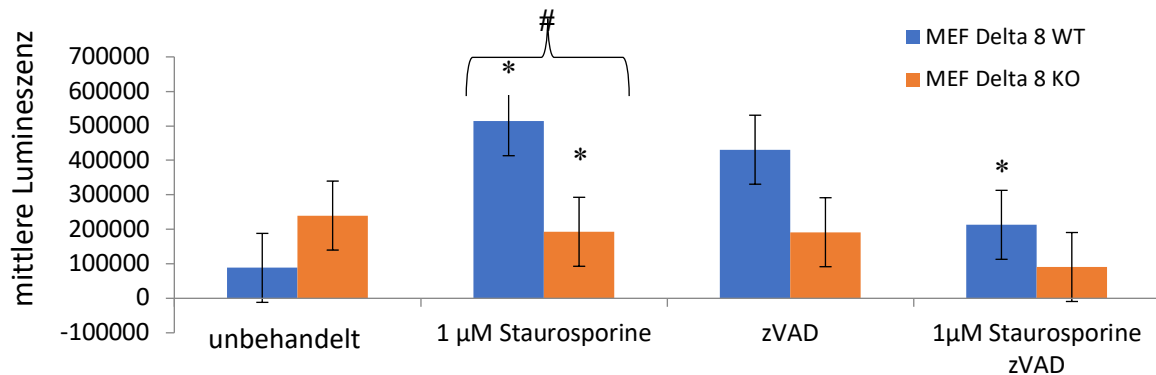


Abbildung 11: Messung der Caspase-8 Aktivität in MEF-MEN1-Wildtyp u. MEF-MEN1-Knockout-Zellen nach 18h Inkubation mit 1µM Staurosporin, zVAD und 1µM Staurosporin+zVAD. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p < 0,05$). Symbol # bedeutet signifikanter Unterschied zwischen MEN1-WT u. MEN1-KO. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung der Werte.

48h Inkubation

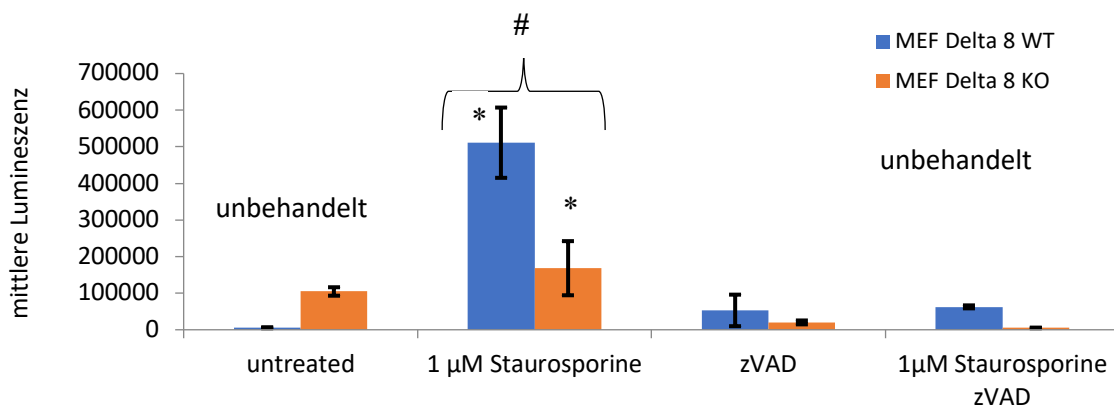


Abbildung 12: Messung der Caspase-3/7 Aktivität in MEF-MEN1-Wildtyp u. MEF-MEN1-Knockout-Zellen nach 18h Inkubation mit 1µM Staurosporin, zVAD und 1µM Staurosporin+zVAD. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p < 0,05$). Symbol # bedeutet signifikanter Unterschied zwischen MEN1-WT u. MEN1-KO. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung der Werte.

BON1-MEN1-Wildtyp vs. BON1-MEN1-Knockdown-Zellen: 6h Inkubation

In diesem Versuch wurde die humane pankreatische Tumorzelllinie, BON1-Zellen, verwendet, die als *in vitro* Modell für pNENs fungierte (Vandamme et al., 2018).

Mittels des Caspase-Glo® 8 Assay und Caspase-Glo3/7-Assay wurden die Aktivitäten der Initiatorcaspase 8 nach 6 Stunden und die Effektorcaspasen 3/7 nach 24 Stunden als Nachweis für Apoptose durch Lumineszenzmessung ermittelt. Mittels siRNA wurde ein transienter Knockdown des MEN1-Gens in der Probe siMEN1 durchgeführt. Die Probe AllStars fungierte als unspezifische siRNA und repräsentiert die MEN1-Wildtyp Probe.

Nach 6-stündiger Inkubationszeit lag eine signifikante Caspase-8 Aktivität in den mit Staurosporin behandelten Proben MEN1-Wildtyp und MEN1-Knockdown vor, wobei die MEN1-Wildtyp Probe eine signifikant höhere Caspase-8 Aktivität als die MEN1-Knockdown Probe aufwies (Abb. 26).

Nach 6-stündiger Inkubationszeit zeigten die mit 1µM Staurosporin behandelten Proben MEN1-Wildtyp und MEN1-Knockdown eine Hochregulation der Caspase-3/7. Der Caspaseinhibitor zVAD bewirkte in allen Proben eine Reduktion der staurosporininduzierten Apoptose durch irreversible Hemmung der Caspasenaktivität.

BON1-MEN1-Wildtyp-/BON1-MEN1-Knockout-Zellen: 24h Inkubation

Die Probe MEN1-Wildtyp wies nach 24-stündiger Inkubation mit 1µM Staurosporin die höchste Caspase-8 Aktivität auf (Abb. 27).

Nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 1µM Staurosporin wiesen die Proben MEN1-Wildtyp und MEN1-Knockdown eine Hochregulation der Caspase-3/7 auf.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass der Apoptosestimulus Staurosporin sowohl nach 6- als auch nach 24-stündiger Inkubation eine Aktivitätssteigerung der Caspase-3/7 bewirkte. Die mit Staurosporin behandelten MEN1-Wildtyp Probe zeigten nach 6-stündiger Inkubationszeit eine signifikant hohe Caspase-8 Aktivität, währenddessen nach 24-stündiger Inkubation lediglich eine Hochregulation vorlag. Auch nach 24-stündiger Inkubationszeit zeigten die Ergebnisse, dass zVAD eine signifikante Reduktion der durch Staurosporin induzierten Apoptose bewirkte.

6h Inkubation

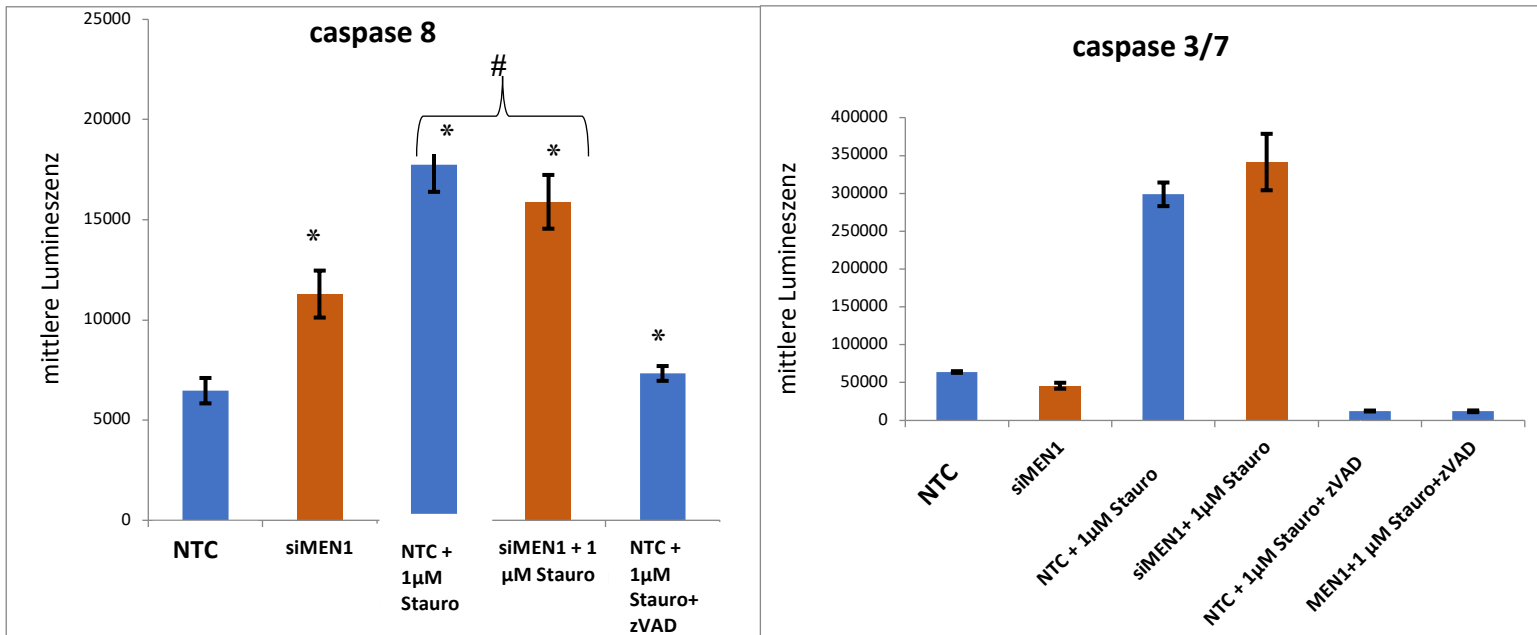


Abbildung 13: Messung der Caspase-8 Aktivität in MEF-MEN1-Wildtyp u. MEF-MEN1-Knockout-Zellen nach 18h Inkubation mit 1µM Staurosporin, zVAD und 1µM Staurosporin+zVAD. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p < 0,05$). Symbol # bedeutet signifikanter Unterschied zwischen MEN1-WT u. MEN1-KO. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung der Werte.

24 h Inkubation

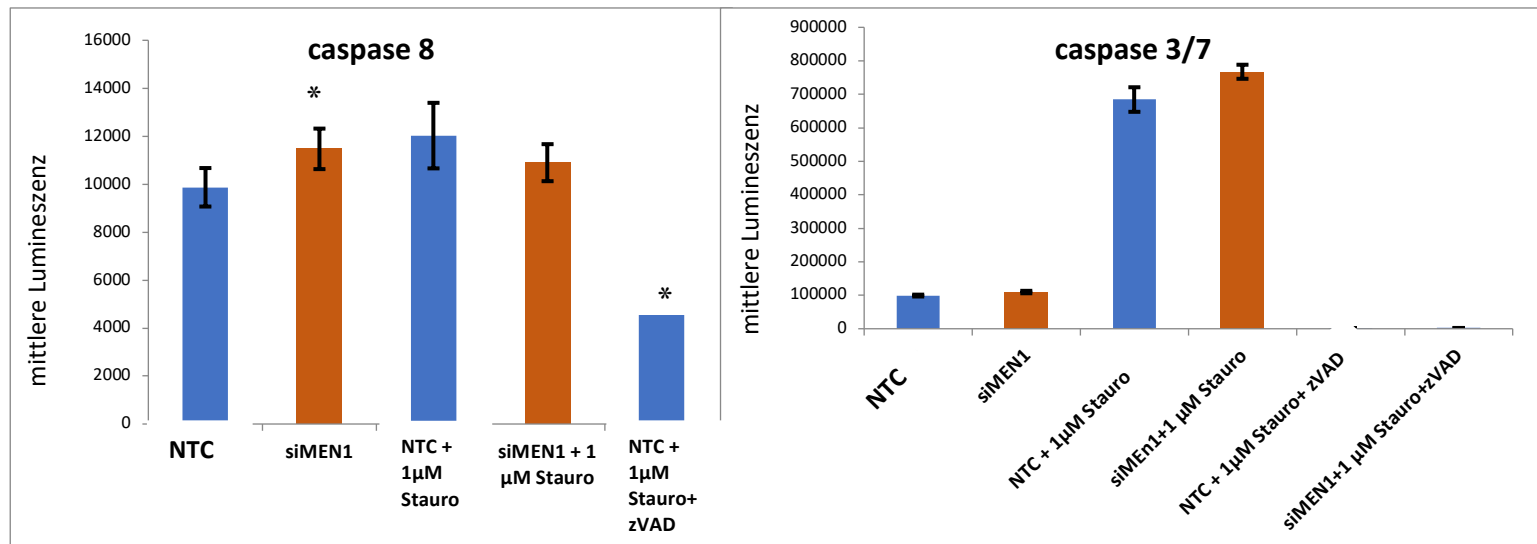


Abbildung 14: Messung der Caspase-3/7 Aktivität in MEF-MEN1-Wildtyp u. MEF-MEN1-Knockout-Zellen nach 18h Inkubation mit 1µM Staurosporin, zVAD und 1µM Staurosporin+zVAD. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p < 0,05$). Symbol # bedeutet signifikanter Unterschied zwischen MEN1-WT u. MEN1-KO. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung der Werte.

QGP1-MEN1-Wildtyp-/QGP1-MEN1-Knockout-Zellen: 6h Inkubation

Die folgende Messung der Caspasetätigkeit wurde anhand der humanen pankreatischen Tumorzelllinie QGP1 durchgeführt, welche aus einem Pankreas-Somatostatinom eines 61-Jährigen in 1980 isoliert wurde [189] [190] [191].

Die Probe MEN1-Wildtyp zeigte nach 6-stündiger Inkubation mit 1 μ M Staurosporin eine höhere Caspase-8 Aktivität als die Probe MEN1-Knockdown behandelt mit 1 μ M Staurosporin (Abb. 28).

Nach 6-stündiger Inkubation mit 1 μ M Staurosporin zeigten die Proben MEN1-Wildtyp und MEN1-Knockdown eine signifikante Aktivitätssteigerung der Caspase-3/7 auf. Durch Zugabe des Caspaseinhibitor zVAD konnte nach 6-stündiger Inkubationszeit mit Staurosporin in der Probe MEN1-Wildtyp die signifikant höchste Aktivität der Caspase-3/7 erreicht werden.

QGP1-MEN1-Wildtyp-/QGP1-MEN1-Knockout-Zellen: 24h Inkubation

Die Ergebnisse zeigten, dass nach 24-stündiger Inkubation mit 1 μ M Staurosporin eine signifikante Caspasen-8 Aktivität in den Proben MEN1-Wildtyp und MEN1-Knockdown erzielt werden konnte (Abb. 29).

Die signifikant höchste Caspase-3/7 Aktivität lag nach 24-stündiger Inkubation mit 1 μ M Staurosporin in der Probe MEN1-Wildtyp vor.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass durch eine Inkubation mit 1 μ M Staurosporin in der MEN1-Wildtyp Probe die höchste Caspase-8 Aktivität nach 6h Inkubation sowie die signifikant höchsten Aktivitäten der Caspase-3/7 nach 6h und 24h vorlagen.

6h Inkubation

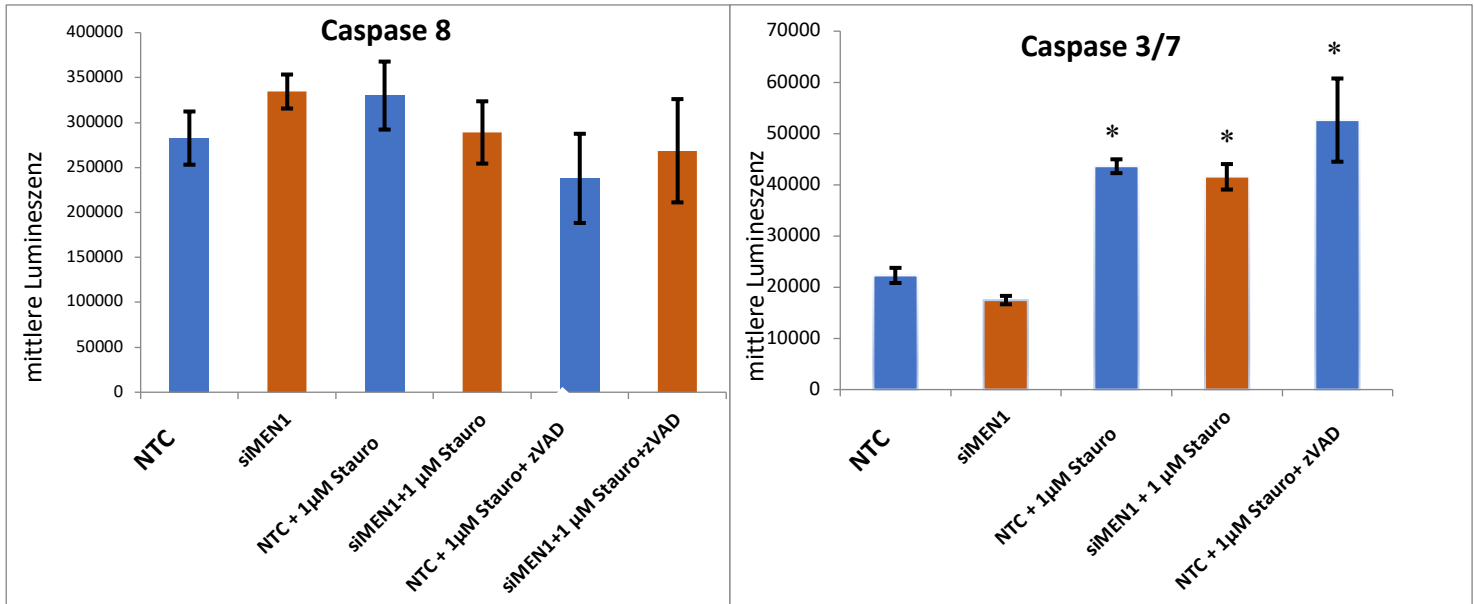


Abbildung 15: Messung der Caspase-8 Aktivität in MEF-MEN1-Wildtyp u. MEF-MEN1-Knockout-Zellen nach 18h Inkubation mit 1µM Staurosporin, zVAD und 1µM Staurosporin+zVAD. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p = < 0,05$). Symbol # bedeutet signifikanter Unterschied zwischen MEN1-WT u. MEN1-KO. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung der Werte.

24h Inkubation

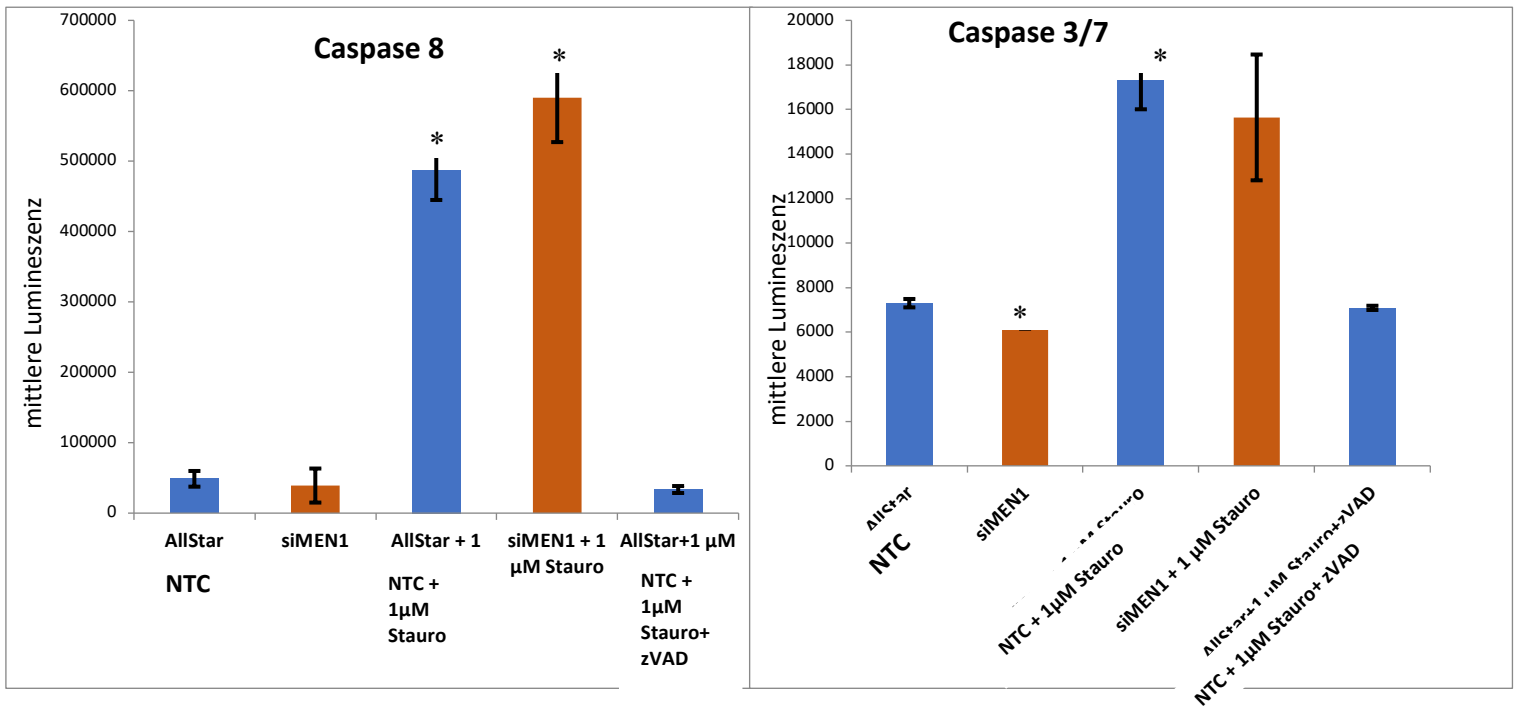


Abbildung 16: Messung der Caspase-3/7 Aktivität in MEF-MEN1-Wildtyp u. MEF-MEN1-Knockout-Zellen nach 18h Inkubation mit 1µM Staurosporin, zVAD und 1µM Staurosporin+zVAD. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p = < 0,05$). Symbol # bedeutet signifikanter Unterschied zwischen MEN1-WT u. MEN1-KO. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung der Werte.

HPSC 2.2-MEN1-Wildtyp-/HPSC 2.2-MEN1-Knockout-Zellen:

6h Inkubation

Der folgende Versuch wurde anhand der pankreatischen Sternzellen HPSC 2.2 durchgeführt. HPSCs sind Fibroblasten und dienen der Bindegewebsherstellung.

Die Probe MEN1-Wildtyp zeigte nach Behandlung mit 1 μ M Staurosporin nach 6h eine signifikant (* 0,05) höhere Caspase-8 Aktivität als die Probe MEN1-Knockdown (Abb. 30).

Die Caspase-3/7 Aktivität war in den mit Staurosporin behandelten Proben MEN1-Wildtyp und MEN1-Knockdown signifikant hochreguliert.

HPSC 2.2-MEN1-Wildtyp-/HPSC 2.2-MEN1-Knockout-Zellen:

24h Inkubation

Nach 24-stündiger Inkubationszeit mit Staurosporin, wiesen die Proben MEN1-Wildtyp und MEN1-Knockdown signifikant hohe Caspase-8 Aktivitäten auf, wobei die MEN1-Wildtyp Probe eine signifikant höhere Aktivität als die MEN1-Knockdown Probe aufzeigte (Abb. 31). Die signifikant höchsten Caspase-3/7 Aktivitäten wiesen ebenfalls die mit Staurosporin inkubierten Proben MEN1-Wildtyp und MEN1-Knockdown auf, wobei eine signifikant höhere Caspase-3/7 Aktivität in der Probe MEN1-Wildtyp behandelt mit Staurosporin vorlag. Der Caspaseinhibitor zVAD bewirkte nach 24-stündiger Inkubationszeit eine Reduktion der Apoptose, welche in den HPSC 2.2 Zellen durch Staurosporin induziert werden sollte. Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse, dass in der Probe MEN1-Wildtyp behandelt mit 1 μ M Staurosporin nach 6h die signifikant höchste Caspase-8 vorlag. Nach 24-stündiger Inkubation lag ebenso die signifikant höchste Caspase-8 und -3/7 Aktivität in der Probe MEN1-Wildtyp behandelt mit 1 μ M Staurosporin vor. Nach 6-stündiger Inkubationszeit zeigte die MEN1-Knockdown Probe eine signifikant geringere Caspase-8 Aktivität verglichen mit der MEN1-Wildtyp Probe. Nach 24-stündiger Inkubation zeigte die MEN1-Knockdown Probe ebenfalls eine signifikant niedrigere Caspase-8 und -3/7 Aktivität als die MEN1-Wildtyp Probe.

6h Inkubation

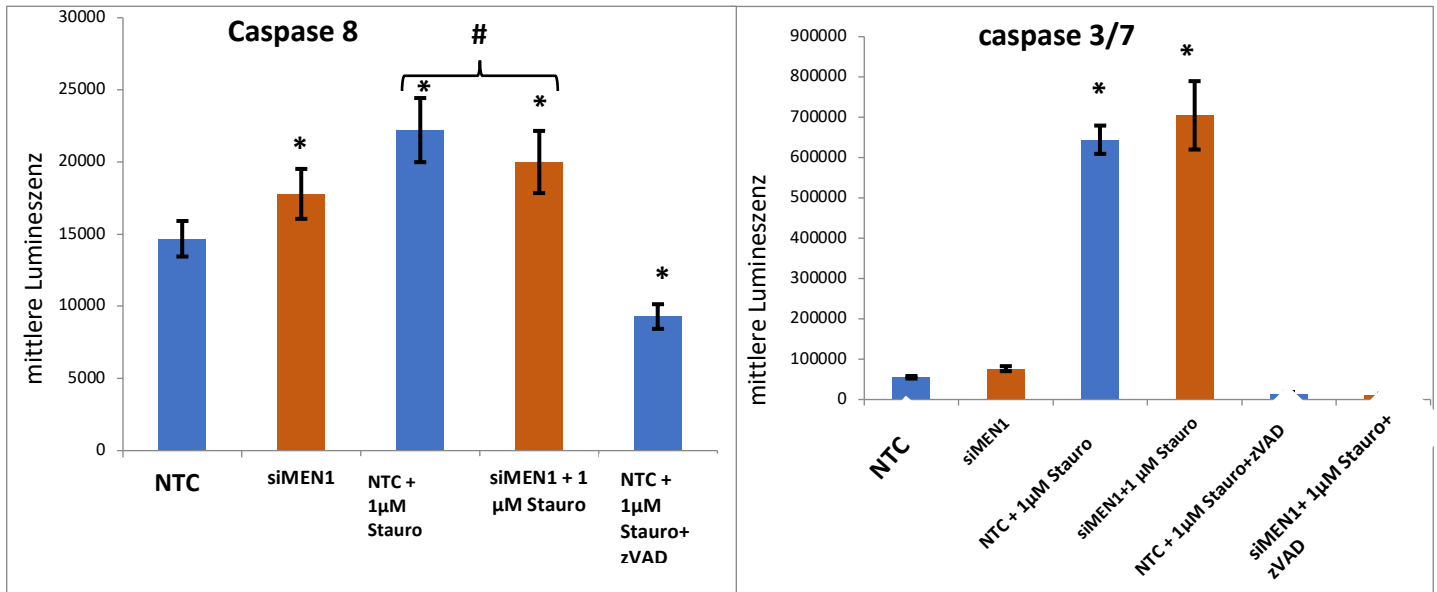


Abbildung 17: Messung der Caspase-8 Aktivität in MEF-MEN1-Wildtyp u. MEF-MEN1-Knockout-Zellen nach 18h Inkubation mit 1µM Staurosporin, zVAD und 1µM Staurosporin+zVAD. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p < 0,05$). Symbol # bedeutet signifikanter Unterschied zwischen MEN1-WT u. MEN1-KO. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung der Werte.

24h Inkubation

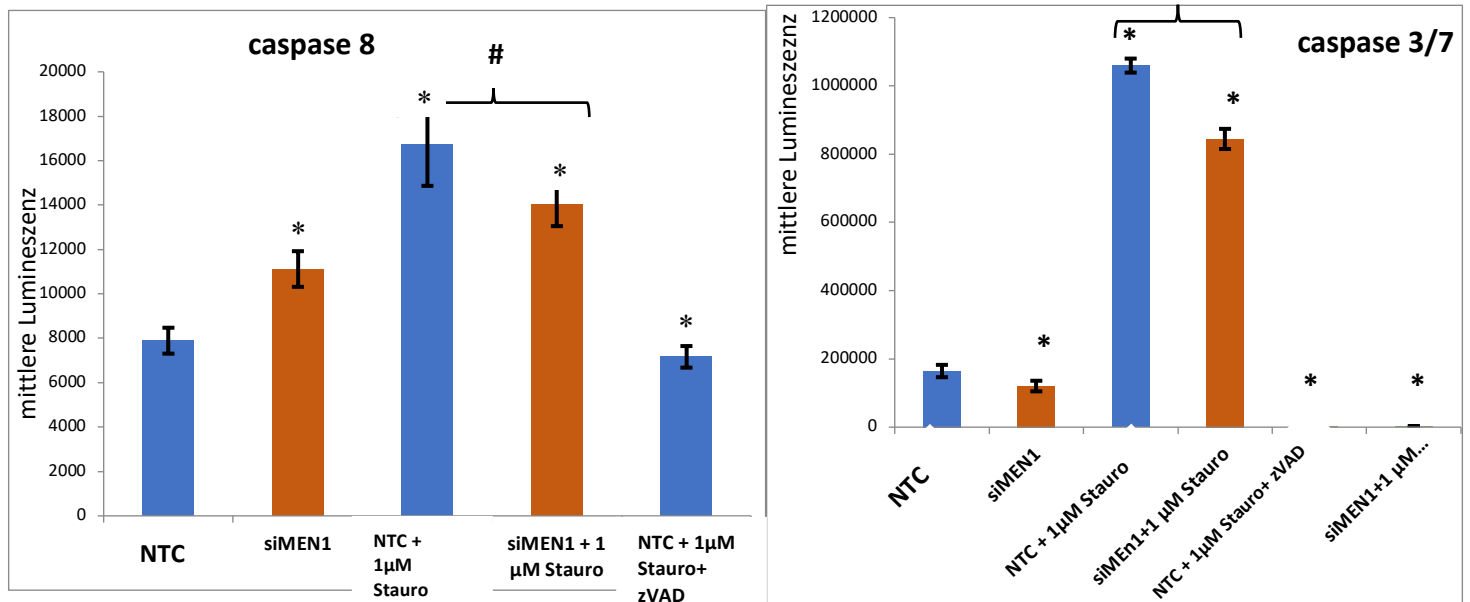


Abbildung 18: Messung der Caspase-3/7 Aktivität in MEF-MEN1-Wildtyp u. MEF-MEN1-Knockout-Zellen nach 18h Inkubation mit 1µM Staurosporin, zVAD und 1µM Staurosporin+zVAD. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p < 0,05$). Symbol # bedeutet signifikanter Unterschied zwischen MEN1-WT u. MEN1-KO. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung der Werte.

4.3 Monozelluläre Tumorsphäroide von MEF-Zellen

In diesem Versuch wurde ein Vergleich der Sphäroiddurchmesser von MEF-MEN1-Wildtyp und MEF-MEN1-Knockout Zellen in Abhängigkeit von verwendeter Zellzahl und Inkubationszeit erarbeitet. Es wurden Zellzahlen von 500, 1.000, 7.000 und 10.000 für 24h-96h inkubiert und ein täglicher Durchschnittswert ermittelt.

Nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 500 MEF-MEN1-WT Zellen und 500 MEF-MEN1-KO Zellen war ersichtlich, dass der Durchmesser des MEN1-KO Sphäroids etwa 200 μ M betrug (Abb.17), wohingegen der MEN1-WT Sphäroid einen Durchmesser von 100 μ M aufwies (Abb. 18).

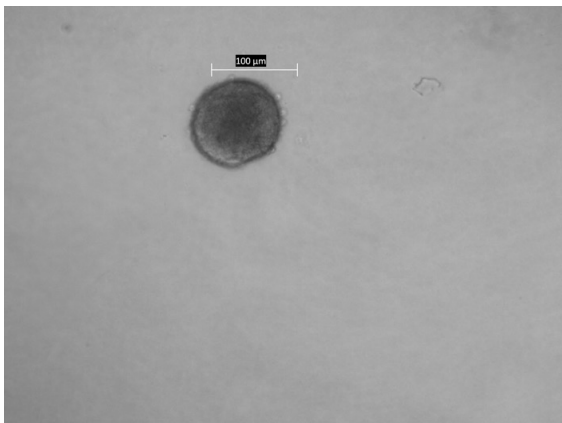


Abbildung 19:

500 MEF MEN1-WT Zellen 24h Inkubation

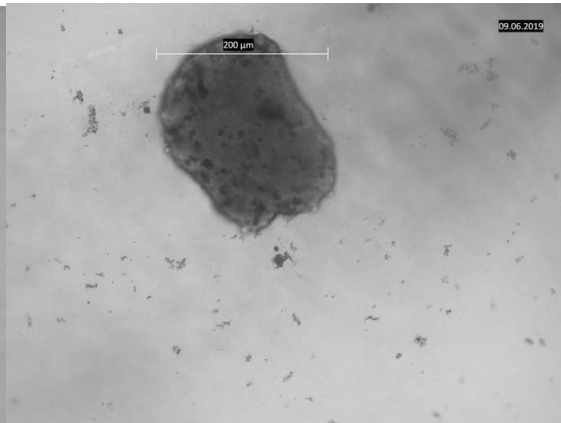


Abbildung 20:

500 MEF MEN1 Knockout Zellen 24h Inkubation

Nach 48-stündiger Inkubationszeit mit 1.000MEF-MEN1-WT Zellen (Abb.20) und 1.000 MEF-MEN1-KO Zellen (Abb. 19) war erkennbar, dass der Durchmesser des MEN1-KO Sphäroids 227,75 μ M betrug, währenddessen der Durchmesser des MEN1-WT Sphäroids etwa 150 μ M betrug.

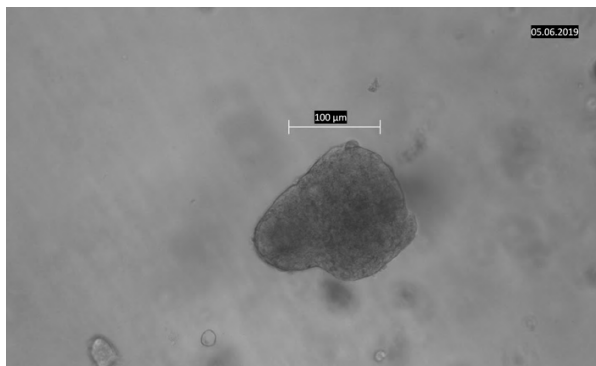


Abbildung 21:

1.000 MEF MEN1 Wildtyp 48h Inkubation

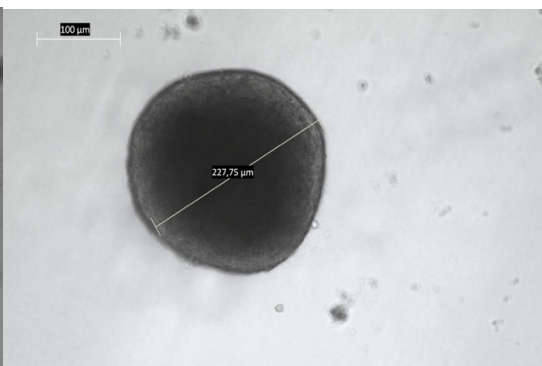


Abbildung 22:

1.000 MEF MEN1 Knockout 48h Inkubation

Nach 48-stündiger Inkubation mit 7.000 MEF-MEN1-WT Zellen (Abb. 22) und 7.000 MEF-MEN1-KO Zellen (Abb. 21) war ersichtlich, dass der Durchmesser des MEN1-KO Sphäroids ca. 300µM beträgt, wohingegen der MEN1-WT Sphäroid einen Durchmesser von maximal 200µM erreichte.

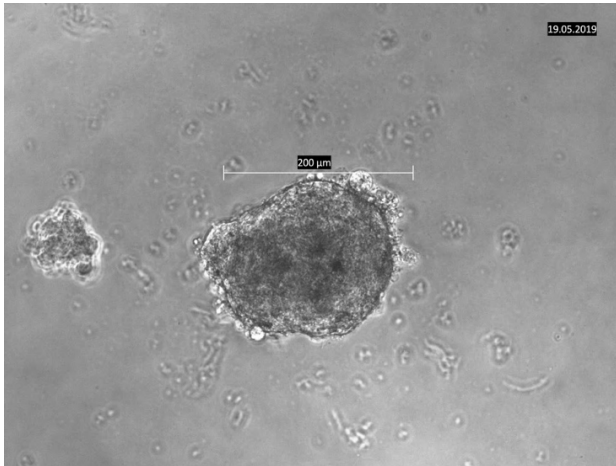


Abbildung 23:
7.000 MEF MEN1-Wildtyp 48h Inkubation

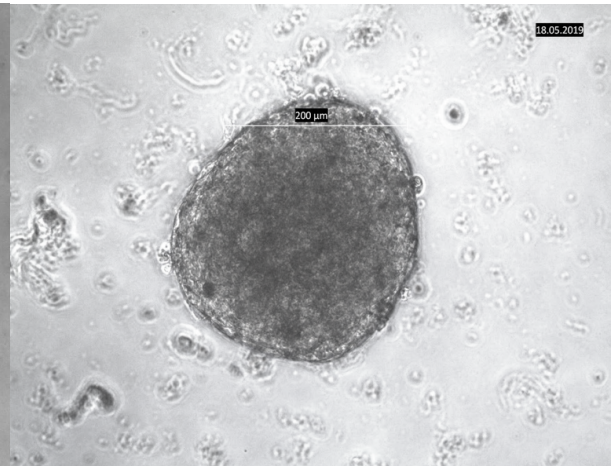


Abbildung 24:
7.000 MEF MEN1-KO Zellen 48h Inkubation

Nach 72-stündiger Inkubation mit 10.000 MEF-MEN1-WT Zellen (Abb. 24) und 7.000 MEF-MEN1-KO Zellen (Abb. 23) war ersichtlich, dass der Durchmesser des MEN1-KO Sphäroids etwa drei Mal größer war im Vergleich zum Durchmesser des MEF-MEN1-WT Sphäroids.

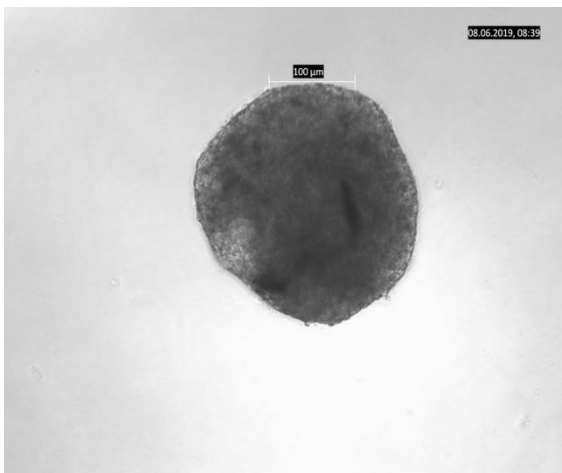


Abbildung 25:
10.000 MEF MEN1-Wildtyp 72h Inkubation

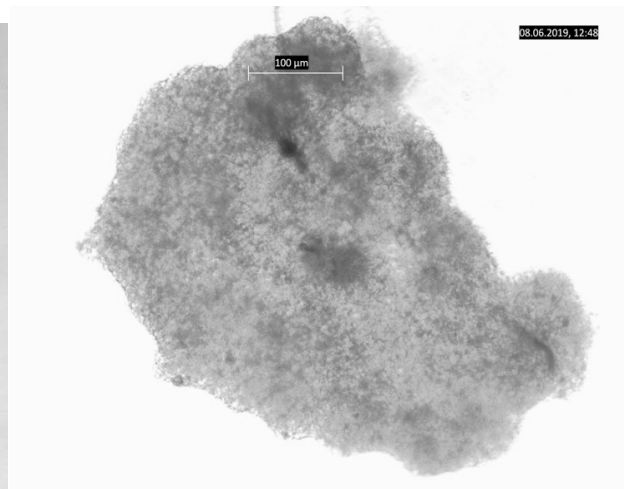


Abbildung 26:
10.000 MEF MEN1 Knockout 72h Inkubation

Abbildung 27 stellt einen Vergleich der durchschnittlichen Sphäroidgröße in μm in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und verwendeten Zellanzahl von MEN1-Wildtyp MEF-Sphäroiden und MEN1-Knockout MEF-Sphäroiden dar.

Es wurden Zellzahlen von 1.000, 2.000, 3.000, 5.000, 7.000 und 10.000 für 24h bis 96h inkubiert und ein täglicher Durchschnittswert ermittelt.

Nach 24-stündiger Inkubation wurde der größte Sphäroiddurchmesser mit $430\mu\text{m}$ von 10.000 MEN1-KO-MEFs erreicht, gefolgt von einem Sphäroiddurchmesser mit $340\mu\text{m}$ bestehend aus 7.000 MEN1-KO-MEFs und einem Sphäroiddurchmesser von $300\mu\text{m}$ bestehend aus 10.000 MEN1-WT-MEFs.

Nach 48-stündiger Inkubation wurde der größte Sphäroiddurchmesser mit etwa $400\mu\text{m}$ von 10.000 MEN1-KO-MEFs erzielt, gefolgt von einem Sphäroiddurchmesser der Größe $350\mu\text{m}$ bestehend aus 10.000 MEN1-WT-MEFs und einem Sphäroiddurchmesser von etwa $340\mu\text{m}$ bestehend aus 7.000 MEN1-WT-MEFs.

Nach 72-stündiger Inkubation wurde ein maximaler Sphäroiddurchmesser mit etwa $380\mu\text{m}$ von MEN1-Knockout-MEFs bestehend aus 10.000 Zellen erreicht. Den zweitgrößten Sphäroiddurchmesser mit etwa $370\mu\text{m}$ weisen MEN1-WT-MEFs bestehend aus 10.000 Zellen auf, gefolgt von MEN1-WT-Sphäroiden der Größe $350\mu\text{m}$, welche sich aus 7.000 Zellen zusammensetzen.

Nach 96-stündiger Inkubationszeit zeigten MEN1-WT-MEFs bestehend aus 10.000 Zellen den größten Sphäroiddurchmesser mit $390\mu\text{m}$ auf. Der zweitgrößte Sphäroiddurchmesser mit $360\mu\text{m}$ wurde von MEN1-WT-MEFs bestehend aus 7.000 Zellen erreicht. MEN1-KO-MEFs wiesen eine durchschnittliche Sphäroidgröße von $330\mu\text{m}$ auf, die aus 10.000 Zellen aufgebaut sind.

Zusammenfassend ließ sich die Aussage treffen, dass 10.000 MEN1-KO-Zellen nach kurzer Inkubationszeit (24h und 48h) die größten Sphäroide aufweisen, die jedoch mit zunehmender Inkubationszeit kontinuierlich an Durchmesser abnehmen, wohingegen 10.000 MEN1-WT-Zellen mit zunehmender Inkubationszeit (72h und 96h) an Durchmesser kontinuierlich zunehmen, sodass MEN1-WT-MEFs nach 96 Stunden die größten Tumorsphäroide aufweisen.

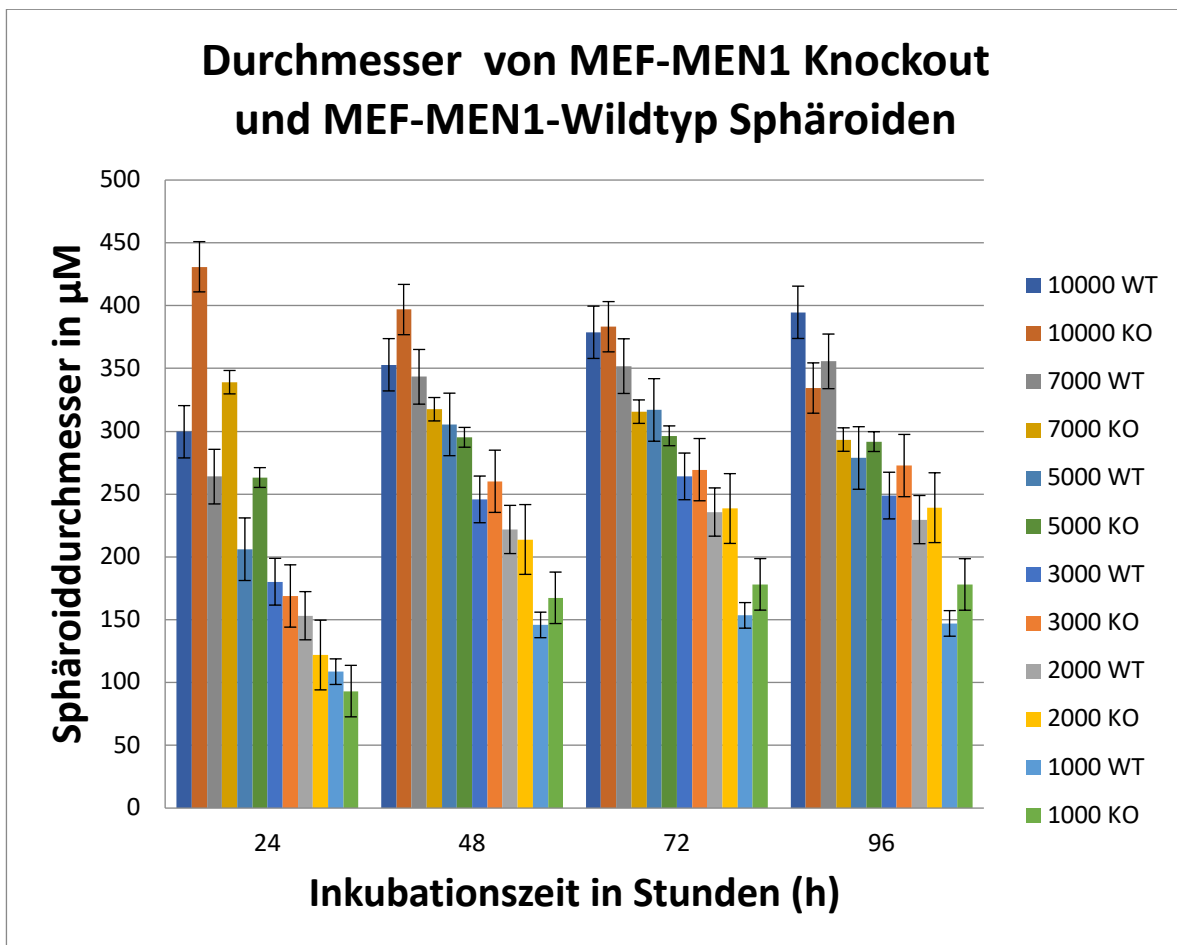


Abbildung 27: Sphäroiddurchmesser in μm von MEF-MEN1 Knockout (KO) und MEF-MEN1-Wildtyp (WT) Zellen im Beobachtungszeitraum von 24h bis 96h. Die x-Achse repräsentiert den Beobachtungszeitraum in Stunden (h), die y-Achse stellt den gemittelten Sphäroiddurchmesser in μm dar. Die farbigen Graphen verdeutlichen die Anzahl der verwendeten Zellen pro Sphäroid. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Werte.

4.4 Monozelluläre Tumorsphäroide von MEF-Zellen unter Staurosporin Inkubation

In diesem Versuch wurde ein Vergleich der Sphäroiddurchmesser und lichtmikroskopisch feststellbaren morphologischen Veränderungen von MEF-MEN1-Wildtyp und MEF-MEN1-Knockout Sphäroiden, die mit $1\mu\text{M}$ Staurosporin behandelt wurden, angestellt.

Es wurden jeweils 1.000 MEF-Zellen für 24h-96h inkubiert und ein täglicher Durchschnittswert der Sphäroidgröße ermittelt.

Nach 24-stündiger Inkubationszeit mit $1\mu\text{M}$ Staurosporin wies das MEN1-WT-Sphäroid (Abb. 29) noch keine wesentlichen Größendifferenzen verglichen mit dem MEN1-KO-Sphäroid (Abb. 27) auf. Das MEN1-WT-Sphäroid zeigte einen deutlich sichtbaren Zellhof um das Sphäroid auf.

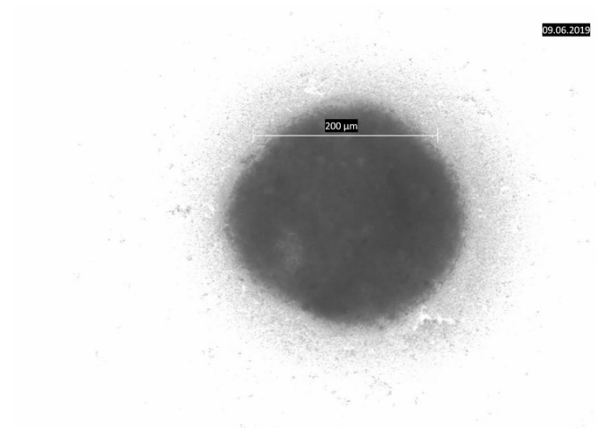


Abbildung 28:
1.000 MEF MEN1 Wildtyp Zellen 24h

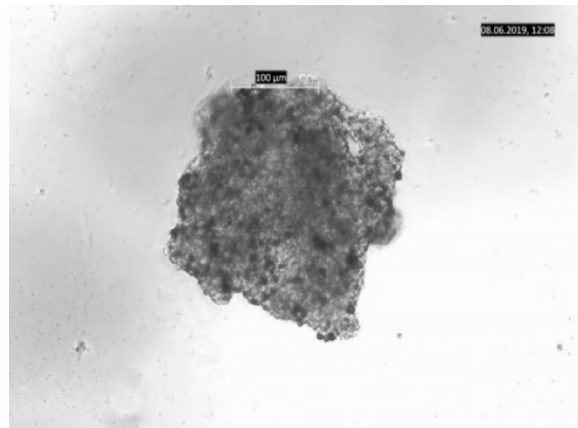


Abbildung 29:
1.000 MEF MEN1 Knockout Zellen 24h

Nach 48-stündiger Inkubationszeit mit $1\mu\text{M}$ Staurosporin war ersichtlich, dass das MEF-MEN1-WT- Sphäroid (Abb. 28) einen Durchmesser von etwa $100\mu\text{m}$ aufwies, wohingegen das MEN1-KO-Sphäroid (Abb. 30) mit etwa $300\mu\text{m}$ einen wesentlich größeren Durchmesser hatte. Mit fortschreitender Inkubationszeit war ein größer werdender Zellhof um das Sphäroid herum zu erkennen. Das MEN1-WT-Sphäroid zeigte nach 48h eine beginnende Zellfragmentierung auf.

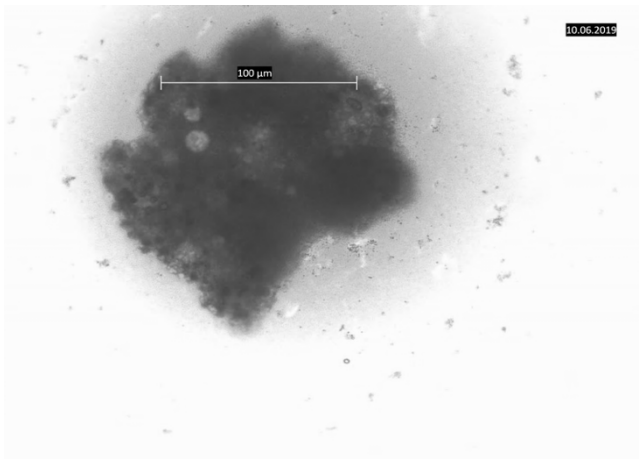


Abbildung 30:
1.000 MEF MEN1 Wildtyp 48h Inkubation

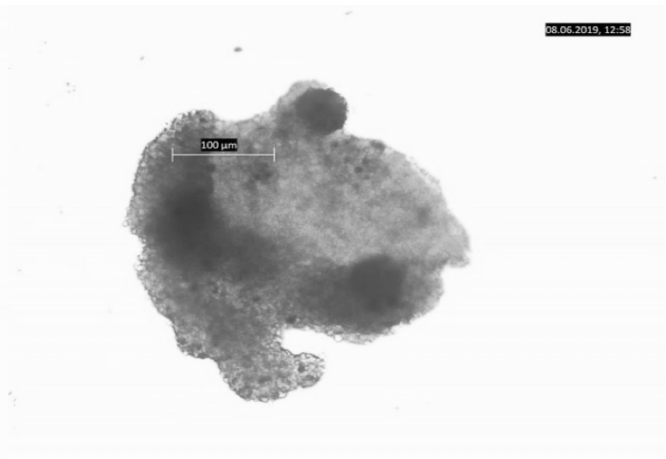


Abbildung31:
1.000 MEF MEN1 Knockout 48h Inkubation

Nach 72-stündiger Inkubation mit 1.000 MEF-MEN1-WT Zellen (Abb. 31) und 1.000 MEF-MEN1-KO Zellen (Abb. 30) war ersichtlich, dass der Durchmesser des MEN1-WT Sphäroids im Vergleich zum MEF-MEN1-KO Sphäroid wesentlich geringer war. Das MEN1-WT Sphäroid wies einen immer größer werdenden Zellhof auf, wobei eine Zellschrumpfung des Sphäroids sichtbar war.

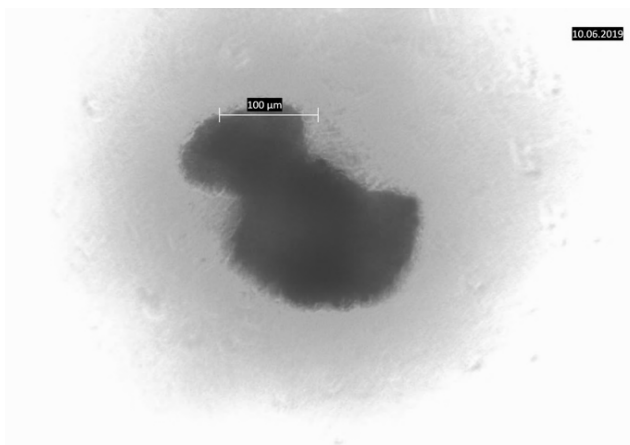


Abbildung 32:
1.000 MEF MEN1 Wildtyp Zellen 72h Inkubation

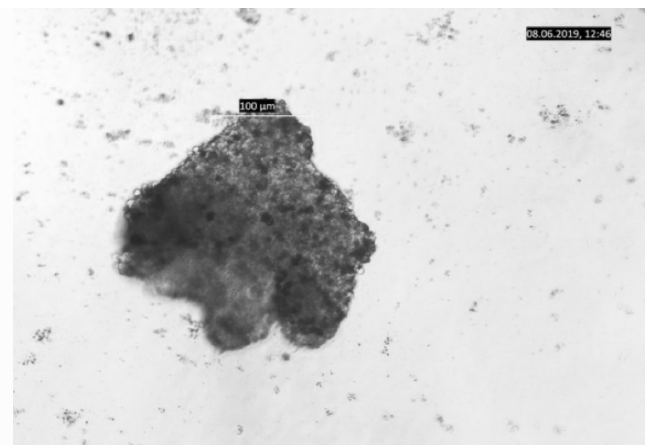


Abbildung 33:
1.000 MEF MEN1 Knockout Zellen 72h Inkubation

Nach 96-stündiger Inkubationszeit mit 1µm Staurosporin war ersichtlich, dass die MEF-MEN1-WT- Sphäroide (Abb. 33) einen Durchmesser von etwa 100µm aufwiesen, währenddessen der Durchmesser des MEN1-KO Sphäroids (Abb. 32) etwa 300µM betrug. Mit 96-stündiger Inkubation zeigte der MEN1-WT-Sphäroid den größten Zellhof.

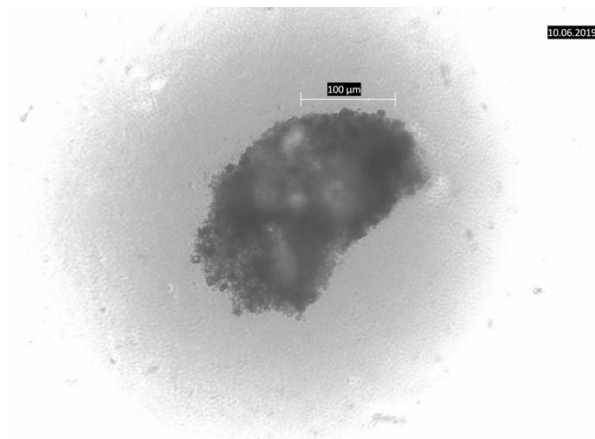


Abbildung 34:

1.000 MEF MEN1 Wildtyp Zellen 96h Inkubation

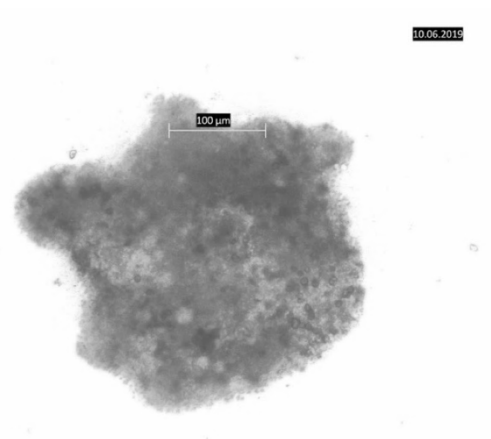


Abbildung 35:

1.000 MEF MEN1 Knockout Zellen 96h Inkubation

Abbildung 36 zeigt eine Gegenüberstellung der durchschnittlichen Sphäroidgröße von MEN1-WT-MEF-Sphäroiden und MEN1-KO-MEF-Sphäroiden, welche jeweils aus 7.000 MEF-Zellen bestanden. Die Zellen wurden unbehandelt bzw. mit 10µm Staurosporin für 24 bis 72 Stunden inkubiert und ein täglicher Durchschnittswert der Sphäroidgröße ermittelt.

Nach 24-stündiger Inkubation wiesen unbehandelte MEN1-WT Sphäroide den größten Durchmesser mit 358µm auf, wohingegen die MEN1-KO Sphäroide eine Durchschnittsgröße von 253µm aufwiesen.

Nach 24-stündiger Inkubation zeigten MEN1-WT Sphäroide, welche mit 10µm Staurosporin behandelt wurden, erneut den größten Durchmesser mit etwa 291µm auf, währenddessen behandelte MEN1-KO Sphäroide einen geringeren Durchmesser mit 218µm aufzeigten.

Nach 48-stündiger Inkubation zeigten behandelte MEN1-WT Sphäroide einen Durchmesser von 289µm auf. MEN1-KO Sphäroide, die mit 10µm Staurosporin behandelt wurden, weisen erneut einen Durchmesser von 213µm auf.

Nach 72 Stunden Inkubation mit 10µm Staurosporin zeigten MEN1-WT Sphäroide nur noch einen Durchmesser von 270µm auf, wohingegen die durchschnittliche Sphäroidgröße bei behandelten MEN1-KO Sphäroiden etwa 207µm betrug.

Zusammenfassend kann man die Aussage treffen, dass bei den MEN1-WT-MEFs mit zunehmender Inkubationszeit eine kontinuierliche Abnahme des Sphäroiddurchmessers zu sehen war, was auf gesteigerte Apoptosevorgänge zurückzuführen ist. Die Reduktion des Sphäroiddurchmessers betrug 25%.

Kontrahär wiesen die MEN1-KO-Sphäroide mit zunehmender Staurosporin Inkubationszeit eine Stagnation des Sphäroiddurchmessers auf, was auf eine geringe bzw. keine Apoptoserate schließen ließ. Die Reduktion des Sphäroiddurchmessers betrug 18%.

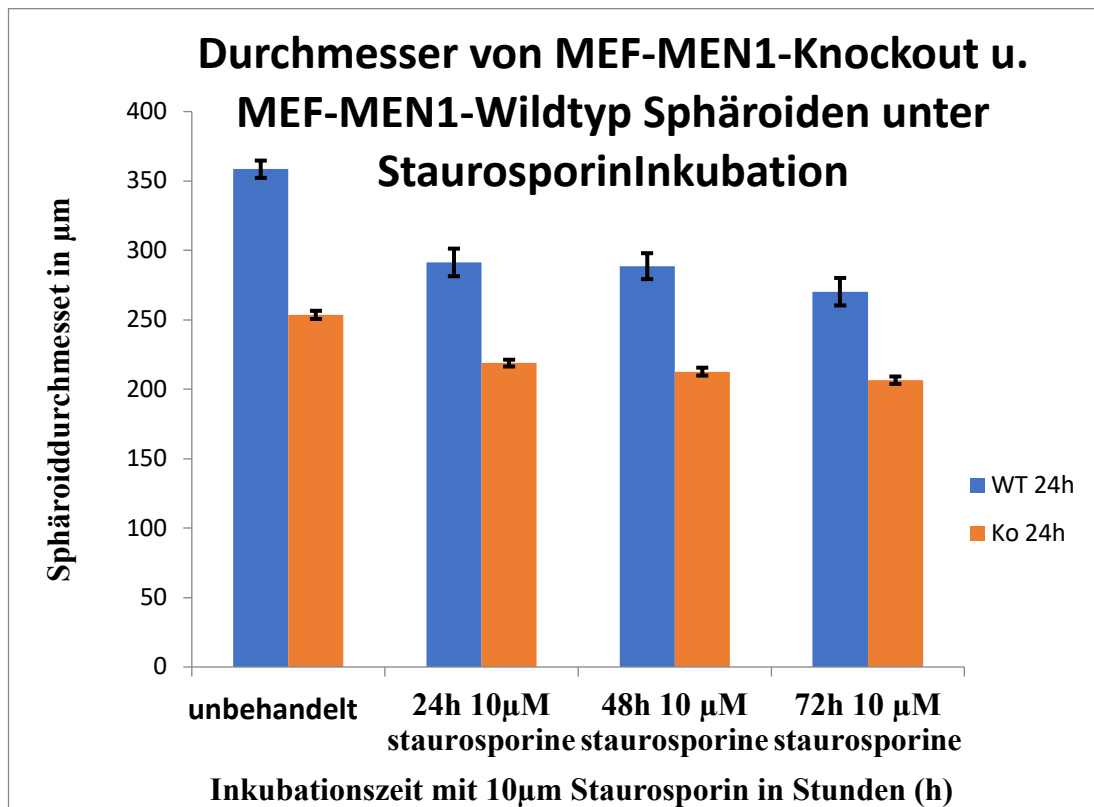


Abbildung 36: Sphäroiddurchmesser in μm von MEF-MEN1 Knockout (KO) und MEF-MEN1-Wildtyp (WT) Zellen im Beobachtungszeitraum von 24h bis 96h. Die x-Achse repräsentiert den Beobachtungszeitraum in Stunden (h), die y-Achse stellt den gemittelten Sphäroiddurchmesser in μm dar. Die farbigen Graphen verdeutlichen die Anzahl der verwendeten Zellen pro Sphäroid.

5. Diskussion

MEN1-Patienten weisen einen eingeschränkten Apoptosemechanismus auf, der zur Tumorentstehung beiträgt [25]. Das MEN1 Gen ist das mit 37-44% [6] am meist mutierte Gen somatischer PNETs [9]. Die hohe Letalitätsrate von *MEN1* Patienten ist auf die metastasierten Gastrinome, Thymuskarzinome und nicht-funktionellen Tumore zurückzuführen [9] [10]. Menin, ein Tumorsuppressorprotein [20], dessen Funktion nach wie vor nicht komplett aufgeklärt ist, zeigt Apoptoseinduktion [21], Hemmung von Zellwachstum [22] durch epigenetische Modifizierung [6], hält den Zellzyklus an [23] und leitet DNA-Reparaturen ein [24].

In dieser Arbeit wurde erstmalig der Ansatz verfolgt, welche Auswirkungen Menin in humanen Tumor-/nicht-Tumorzelllinien, sowie in Mäuseembryofibroblastenzellen aufweist.

5.1 MEN1, CDKN1A und TP53-Genexpression

Die Expressionsmessungen in unseren humanen Tumorzelllinien QGP1, BON1 sowie in der nicht-Tumorzelllinie HPSC 2.2 zeigten beim reversiblen Knockdown des *MEN1* Gens eine Expressionsreduktion von *MEN1*, *CDKN1A* und *TP53*. Der Apoptosestimulus Staurosporin zeigte in der von uns verwendeten Tumorzelle QGP1 die stärkste Aufregulation von *TP53*. Wir wählten die Gene *TP53* und *CDKN1A* aus, um zu untersuchen, ob es funktionelle Wechselwirkungen und Abhängigkeiten mit dem *MEN1* Gen in der Apoptose gibt, da das Tumorsuppressorprotein 53 in 50% aller menschlichen Tumore mutiert ist [122] und p21 den Zellzyklus hemmt, um DNA Schadensreparaturen durchzuführen [130]. Wir verwendeten die humane endokrine Tumorzelllinie BON1, eine Lymphknotenmetastase eines Serotonin produzierenden pNEN (Karzinoid) des Pankreas [138], wo wir einen reversiblen *MEN1*-Knockdown mit siRNA erzielten. Unsere zweite Tumorzelllinie QGP1 wurde aus einem Pankreas-Somatostatinom eines 61-Jährigen isoliert und fungierte als Modell eines schlecht-differenzierten neuroendokrinen Karzinom [149] [150] [151] [137] [192]. Vergleichend zogen wir die nicht-Tumorzelllinie HPSC 2.2, eine humane pankreatische Sternzelle, heran, die einen Ki-67 Index von 22,2% [167] aufweist. Benten et al. machte in 2018 die Aussage, dass BON1 und QGP1 einen Ki-67 Index von 80% und 82,6% aufweisen, entsprechend einem schlecht-differenzierten endokrinen Karzinom [137]. Darüber hinaus stellte Benten et al. eine *TP53* Mutation in beiden Zelllinien fest. Mafficini et al. und Bazzi et al. zufolge sind G3-GEP NECs im Unterschied zu GEP-NETs durch eine *TP53* Mutation

gekennzeichnet [192]. Wir verwendeten den Apoptosestimulus 1µM Staurosporin zur Induktion von Apoptose in den beiden Tumorzelllinien und der HPSC 2.2. Zelllinie. Damit wollten wir die Auswirkungen des reversiblen MEN1-Knockdown vor dem unterschiedlichen Zellhintergrund hinsichtlich Apoptose, funktionelle Wechselwirkungen mit *TP53* und *CDKN1A* auf mRNA Ebene und mögliche Staurosporineffekte untersuchen. Im Rahmen einer Studie von Kumar et al. zur Untersuchung der *TP53* Genexpression in T-Zell Lymphomzellen der Maus wurden *TP53*-Wildtyp DL-Zellen und *TP53* RNAi-DL Zellen, die einen reversiblen *TP53* Knockdown aufzeigten mit 1µM Staurosporin für 1h, 3h und 6h inkubiert [108]. Staurosporin bewirkte bei Kumar et al. einen signifikanten Expressionsanstieg an phosphoryliertem *TP53* nach 1h und 6h. Porcelli et al. konnte in der humanen Blasenkrebszelllinie ECV-304 zeigen, dass Staurosporin als Goldstandard zu einer sehr schnellen Apoptose [108] [109] innerhalb von 4h bis maximal 8-16h führt [110].

Unsere Ergebnisse jedoch zeigten signifikante Genexpressionen erst nach 24h und 48h Inkubation mit Staurosporin. Wir konnten in der humanen endokrinen Karzinomzelllinie QGP1 zeigen, dass 1µM Staurosporin nach 48h Inkubation einen *TP53*-mRNA Anstieg bei *MEN1*-Wildtyp und *MEN1*-Knockdown Zellen bewirkte, wobei die *TP53* Aktivierung bei den *MEN1*-Knockdown Zellen signifikant war. Analog zu den Ergebnissen von Kumar et al. in Lymphomzellen der Maus konnten wir in der humanen Karzinomzelllinie QGP1 durch Staurosporin eine *TP53* Aktivierung zeigen [108].

Betrachtet man die von uns verwendete BON1-Zelllinie ist zu sagen, dass der reversible *MEN1* Knockdown mit einer Reduktion der *TP53* Genexpression einherging. Interessanterweise zeigte unsere humane Sternzelle HPSC 2.2. auch keinen Anstieg der *TP53* Genexpression nach 24h und 48h. Ob der in QGP1-Zellen beobachtete Anstieg der *TP53*-Expression nach Staurosporinbehandlung trotz Vorliegen einer *TP53* Mutation und trotz Ausbleiben eines ähnlichen Effekts in den anderen untersuchten Zelllinien ursächlich an der Auslösung von Apoptose beteiligt ist muss daher in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Bazzi et al. untersuchte die funktionellen Wechselwirkungen von *MEN1*-Missense Mutationen in der INS-1 Ratteninsulinomzelllinie bezüglich Apoptose und Verbindungen mit *TP53* und *CDKN1A* [25]. Wir induzierten Apoptose mit 1µM Staurosporin, wohingegen Bazzi et al. Apoptose durch Bestrahlung (10Gy) induzierte [25]. Die Studie von Bazzi et al. zeigte auf mRNA und Proteinebene, dass WT-Menin Überexpression in INS1-Ratteninsulinomzellen mit p53-Acetylierung und beschleunigter p21-Aktivierung während der Apoptose einhergeht [25]. Bazzi et al. zufolge ist die *MEN1*-Wildtyp Genexpression in

BON1 Zellen vergleichbar mit INS-1 Ratteninsulinomzellen [25]. Unsere Ergebnisse der BON1 Zelllinie zeigten, dass der reversible MEN1 Genknockdown erst nach 48h vorlag, einhergehend mit einer Herunterregulation von *TP53* und *CDKN1A*. Nach 24h Inkubation, bei noch vorliegender *MEN1* Wildtyp Genexpression, zeigten unsere Ergebnisse, dass eine signifikante Hochregulation der Gene *CDKN1A* und *TP53* ohne Staurosporineinfluss vorlag. Unsere Ergebnisse der BON1 Zelllinie bestätigten die Aussage von Bazzi et al., dass *MEN1* Wildtyp mit einer gesteigerten Aktivität von *TP53* und *CDKN1A* einhergeht. Betrachtet man die von uns verwendete QGP1 Zelllinie hinsichtlich der *TP53* Genexpression war auffallend, dass sowohl bei Vorliegen des reversiblen *MEN1*-Knockdown nach 24h und bei Regeneration des reversiblen *MEN1*-Knockdown nach 48 eine Aufregulation der *TP53* Genexpression vorlag. Es bleibt unklar, warum Staurosporin eine Aufregulation in der von uns verwendeten schlecht-differenzierten QGP1 Karzinomzelllinie bewirkte. Ein ganz anderes Verhalten war in unserer humanen Sternzelle HPSC 2.2 zu beobachten, da sowohl bei Vorliegen des *MEN1*-Knockdown als auch bei Regeneration des *MEN1*-Knockdown stets eine Herunterregulation der Gene *TP53* und *CDKN1A* vorlag. Im Unterschied zu unseren beiden Tumorzelllinien war bei HPSC 2.2 Zellen eine zeitlich verzögerte Aufregulation von *TP53* und *CDKN1A* zu vermuten. Der Unterschied ist darauf zurückzuführen, dass unsere HPSC 2.2. Zelllinie nicht aus neuroendokrinem Tumorgewebe isoliert wurde und ein ungeeignetes Modell zur Untersuchung der Tumorgenese in pNENs darstellte. Unter kritischer Betrachtung der eigenen Methodik unserer Arbeit ist anzumerken, dass es wünschenswert wäre in zukünftigen Arbeiten die Expressionen von *MEN1*, *CDKN1A* und *TP53* auch auf Proteinebene zu untersuchen, um diese mit den Genexpressionen vergleichen zu können.

Kritisch ist an der Studie von Bazzi et al. zu bemerken, dass die Ergebnisse des verwendeten *in vitro* Modells zur Tumorgenese bei Insulinomzellen der Spezies Ratte nicht ohne weiteres übertragbar auf die humane pNEN Tumorgenese ist [25]. Ferner berücksichtigte das *in vitro*-Modell von Bazzi et al. nicht den Tumordifferenzierungsgrad, da wir Unterschiede zwischen humanen Tumorzelllinien feststellten.

5.2 BON1, HPSC 2.2, QGP1 und MEF Zellen Caspasenaktivität

Unsere Ergebnisse zeigten, dass das MEN1-Gen eine signifikante Aufregulation der Initiatorcaspase-8 und Effektorcaspase-3/7 in der humanen Zelllinie HPSC 2.2. und Mäuseembryofibroblastenzelle nach Staurosporininkubation bewirkte.

Wir verwendeten Primärzellen aus Mäuseembryonen, welche aus den Embryos einer 14 Tage trächtigen Maus [168] isoliert wurden. Mit dem Ziel, die genaue Funktion von Menin zu erforschen, zeigten die von uns verwendeten *MEN1*-Knockout MEFs einen permanenten Knockout dieses Gens auf.

Der von uns durchgeführte reversible *MEN1*-Knockdown mit siRNA reduzierte die *MEN1*-Genexpression hingegen temporär auf mRNA Ebene. Im Unterschied zu unserem Knockdown blockierte unser Knockout auf DNA-Ebene die Genexpression vollständig, währenddessen unser Knockdown eine Wiederherstellung der ursprünglichen Genexpression ermöglichte.

Im Rahmen einer Studie von La et al. in *MEN1*-Knockout MEFs konnte gezeigt werden, dass Menin die Genexpression der Initiatorcaspase 8 steigerte, indem es an den Lokus der Caspase-8 bindet und per Genexpression eine Aufregulation der Caspase-8 bewirkte [26]. Unsere Ergebnisse konnten ebenfalls zeigen, dass Menin auch in unseren *MEN1*-Knockout MEFs nach 18-stündiger Staurosporin-Inkubation und in humanen HPSC 2.2 Zellen nach 6-stündiger Staurosporin-Inkubation zu einer signifikanten Aufregulation von Caspase-8 führte.

Bazzi et al. zeigte in INS-1-Ratteninsulinomzellen, dass Wildtyp Menin nach Bestrahlung (10Gy) nach 2h bis 24h mit einer zunehmend gesteigerten Caspase-3 Aktivierung einherging [25]. Im Rahmen der Studie von Bazzi et al. konnte eine gesteigerte Aktivität der intrinsischen Apoptose sowie der gemeinsamen Endstrecke durch Caspase-9 und -3 Aktivierung in INS-1 Ratteninsulinomzellen bei *MEN1*-Wildtyp Zellen nach Bestrahlung festgestellt werden. Im Unterschied zu unseren Ergebnissen konnte Bazzi et al. keine gesteigerte Caspase-8 Aktivierung in INS-1 Ratteninsulinomzellen bei *MEN1*-Wildtyp Zellen nach Bestrahlung nachweisen. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf Spezies-spezifische Unterschiede in der Aktivierung der ex- oder intrinsischen Apoptosesignalwege in *MEN1*-Wildtyp Zellen zurückzuführen, weil wir in Mäuseembryofibroblastenzellen eine Aktivierung des extrinsischen Apoptosesignalwegs und der gemeinsamen Endstrecke durch signifikant gesteigerte Caspase-8 und -3/7 Aktivität feststellten.

Es ist festzuhalten, dass das *in vitro* Modell zur Caspasenaktivierung von Bazzi et al. in Ratteninsulinomzellen mit unseren Ergebnissen der humanen Tumorzelllinie BON1 und QGP1 übereinstimmten, da auch wir eine signifikante Caspase-3/7 Aktivierung in der QGP1 Zelllinie sowie eine signifikant gesteigerte Caspase-8 Aktivierung in der BON1 Zelllinie nach Staurosporin Inkubation zeigen konnten.

Im Unterschied zur Bazzi et al. stellten wir in den MEF Zellen erst nach 18h und 48h eine signifikant gesteigerte Caspase-8 und 3/7- Aktivität fest, wohingegen Bazzi et al. in INS1-Ratteninsulinomzellen eine gesteigerte Caspase-3 Aktivität nach 2h bis 24h feststellte.

Anzumerken ist, dass unsere Ergebnisse nur bei den nicht-Tumorzelllinien HPSC 2.2. und MEF Zellen einen signifikanten Unterschied zwischen *MEN1*-Wildtyp und Knockdown/Knockout bei der Caspasen-8 und-3/7 Aktivierung zeigten. Der *MEN1*-Wildtyp scheint in unserer nicht-Tumorzelllinie HPSC 2.2. und unserer MEF-Zelllinie eine höhere Apoptoserate zu bewirken.

5.3. Sphäroide

Die Ergebnisse unserer Sphäroid-Experimente zeigten bei allen verwendeten Zellzahlen von 500 bis 10.000 einen größeren Durchmesser und schnelleres Wachstum der MEF-*MEN1*-KO Sphäroide als in MEF-*MEN1*-WT Sphäroide auf.

In unserer Arbeit erfolgten technische Replikate mit einem einzigen Durchgang von 3D-Sphäroiden anhand von MEF-*MEN1* Wildtyp und MEF-*MEN1* Knockout Sphäroiden, die mit Staurosporin für 24h bis 96h inkubiert wurden. Diese Methode wurde von uns gewählt, da Sphäroide durch ihre Dreidimensionalität die *in vivo*-Umgebung und Zell-Matrix Wechselwirkungen von Geweben im Vergleich zu 2-D Kulturen berücksichtigten. Matrood et al. nutzte in 2020 ebenfalls die Methode der Sphäroide, um Autophagiemarker durch RT-qPCR, Immunfloreszenz und Western Blotting in HPSC 2.2. nach Inkubation mit Panobinostat zu detektieren [193]. Allerdings wurden in diesen Untersuchungen keine Sphäroide von pankreatischen Tumorzellen zur Untersuchung von Autophagie in neuroendokrinen Neoplasien verwendet [193].

Die Sphäroide stellten in unserer Arbeit einen explorativen Ansatz dar, um die Größenveränderung und die Unterschiede zwischen MEF-*MEN1*-KO und MEF-*MEN1* Wildtyp Sphäroiden zu den Inkubationszeiten von 24h bis 96h zu erforschen. Zusätzlich wäre es interessant gewesen, in unserer Arbeit Apoptosemarker zu detektieren bzw. eine Caspasenaktivitätsmessung vorzunehmen, um unsere Ergebnisse mit den Caspasenaktivitätsmessungen in den 2-D MEF Zellkulturen vergleichen zu können.

Beim Größenvergleich von unseren MEF-*MEN1* KO Sphäroiden mit MEF-*MEN1*-WT Sphäroiden fiel auf, dass alle *MEN1*-KO Sphäroide einen größeren Durchmesser als die *MEN1*-WT Sphäroide aufzeigten, was für eine größere Zellproliferationsrate und geringere Apoptoserate in den KO-Zellen auch unter 3D-Bedingungen spricht. Unsere Ergebnisse der mit Staurosporin behandelten MEF-Sphäroide zeigten, dass mit zunehmender

Inkubationszeit eine kontinuierliche Größenreduktion der *MEN1* aktiven Sphäroide vorlag, wohingegen *MEN1*-KO Sphäroide keine Größenveränderung zeigten. Dies scheint auf eine höhere Apoptoserate in MEF-*MEN1* WT Zellen durch Staurosporin zurückzuführen zu sein. Schlussfolgernd ist die Aussage zu treffen, dass der *MEN1*-KO sowohl in unstimulierten als auch in Staurosporin-behandelten Sphäroiden über ein weites Spektrum von Ausgangszellzahlen hinweg mit höheren Wachstumsraten und erhöhter Apoptoseresistenz einherging. Dies muss jedoch in unabhängigen Versuchsdurchgängen bestätigt werden.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden Apoptoseraten und Genexpressionen von *MEN1*, *CDKN1A* und *TP53* erstmalig in humanen Tumor- und nicht-Tumorzelllinien sowie MEF Zellen untersucht.

Durch reversiblen Knockdown des *MEN1* Gens konnte in all unseren drei Zelllinien BON1, HSCPs und QGP1 eine Herunterregulation der Genexpressionen festgestellt werden. Bemerkenswerterweise zeigte die von uns verwendete humane schlecht-differenzierte Karzinomzelllinie QGP1 [192] eine wesentlich höhere *TP53* Genexpression als die nicht-Tumorzelllinie HPSC 2.2. Die Vermutung liegt nahe, dass die Auswirkungen von Staurosporin abhängig vom Zellhintergrund ist. In unserer MEF- und der humanen nicht-Tumorzelllinie HPSC 2.2. konnte eine signifikante Aufregulation der Caspasen-8 und -3/7 festgestellt werden, sodass man die Aussagen treffen kann, dass in diesen Zelllinien die Apoptose begünstigt wird. Deshalb ist ein interessanter Ansatz für weitere Forschungen, Gewebeproben von *MEN1* Tumorpatienten auf *TP53* Mutation in Zusammenhang mit der Höhe des Tumorgradings zu untersuchen.

Wir gehen davon aus, dass eine geringere Apoptoserate mit einer höheren Zellproliferation der neuroendokrinen Tumoren von *MEN1*-erkrankten Tumorpatienten einhergeht. Die nähere Beleuchtung des Zusammenhangs zwischen Menin und Apoptose ist insbesondere hinsichtlich weiterer klinischer Therapiemöglichkeiten interessant, da *MEN1* autosomal dominant vererbt wird und häufig nur die Operation als kurative Maßnahme in Frage kommt. Interessant ist zu schauen, ob apoptosestimulierende Medikamente Einfluss auf *MEN1* Patienten haben.

Aus der Literatur geht hervor, dass die Apoptoserate durch Menin in Form von epigenetischen Modifikationen beeinflusst wird. Per Transkriptionshemmung unterbindet Menin die Herstellung des hTERT-Proteins, das in 90% aller menschlichen Tumorzellen überaktiv ist [194] [195]. Eine Überaktivität der hTERT bei Ausfall von *MEN1* und *TP53*

verhindert die physiologische Apoptoseinduktion in Tumorzellen [196]. Anzustreben ist bei *MEN1*-Familien, die noch ein intaktes *MEN1*-Allel besitzen, dies zu stärken, durch epigenetische Modulatoren, Bevacizumab, Sunitib, RTK-Inhibitoren, Everolimus, Octreotide, Lanreotide, β -Catenin-Antagonisten und *MEN1*-Genersatztherapie [197]. Medikamentös sind die pro-apoptotischen und wachstumshemmenden Interaktionen Menins mit 40 Proteinen nicht zu ersetzen. Ein Ansatz stellen epigenetische Modulatoren dar, da *MEN1*, *DAXX* und *ATRX* die häufigst mutierten Gene in pNENs sind, und nur in Kombination mit *MEN1* wachstumsreduzierend und apoptosefördernd agieren [198] [199], [200] [201]. Lines et al. berichtete, dass Menin mit Histonmethyltransferasen interagiert, DNA-Methylierungen/Demethylierungen ausführt und mit den epigenetischen Modulatoren JUND, MLL, PRMT5, SMAD3 und β -Catenin zusammenarbeitet. Lines entdeckte die epigenetischen Hemmstoffe JQ1 und PFI-1, die mittels CaspaseGlo in den Zellen BON1 einen 2-3,6-fache apoptosefördernden und einen 40-85% proliferationshemmenden Effekt zeigten [202]. Ansatzpunkt der Medikamente war die BET-Proteinfamilie, welche an acetylierte Histonreste bindet [202]. Der proapoptotische und antiproliferative Effekt von JQ1 wurde *in vivo* anhand von *MEN1*-Knockout Mäusen durch eine 3-fache Apoptosesteigerung und 50%ige Proliferationshemmung bestätigt. Hemmstoffe der BET-Proteinfamilie fungieren als therapeutischer Ansatz von pNENs [202].

Unsere Ausarbeitung zeigte, dass es schwer realisierbar ist, Menins umfangreiche komplexe Verzweigung durch Medikation zu ersetzen. Frost, Lines und Thakker berichteten, dass die *MEN1*-Genersatztherapie durch Injektion eines *MEN1*-cDNA beinhaltenden adenoviralen Serotyp 5-Vektors (rAd5-*MEN1* in Hypophysen- NENs von *MEN1*-Knockout Mäusen durchgeführt wurde. Der Therapieerfolg konnte durch eine erhöhte Meninexpression mit resultierender Proliferationshemmung der Hypophysen- NENs bewiesen werden. Die *in-vitro* *MEN1*-Genersatztherapie ging nicht mit einer gesteigerten Sterblichkeitsrate einher und ist als zukünftiger Therapieansatz in Betracht zu ziehen [203]. Bewiesen wurde durch Wu et al., dass die *MEN1*-Inaktivierung in humanen Lungenadenokarzinomen durch K-Ras induzierte DNA-Methylierung des *MEN1*-Promoters zustande kommt [204]. In humanen Lungenadenokarzinomen ging eine gesteigerte K-Ras-Genexpression mit einer reduzierten *MEN1*-Genexpression einher [204]. Die o.g. Aussagen erklären, dass bei Ausfall von Menin nicht nur die Apoptose reduziert wird, sondern auch die Proliferationswege überhand nehmen, sodass Zellwachstum dominiert. Seit 2017 ist das Staurosporinderivat Midostauron zur Behandlung von AML und systemischer Mastozytose in den USA im klinischen Einsatz [205]. Ein weiterer Ansatz ist die therapeutische Verwendung von Staurosporinderivaten.

Die klinische Einsetzbarkeit von Staurosporin und Derivaten hat leider in der Vergangenheit keinen durchschlagenden Erfolg wegen mangelnder Spezifität und erhöhter Toxizität gezeigt [206] [207] [208].

6 Literaturverzeichnis

- [155] Abbas T. and A. Dutta, "P21 in cancer: Intricate networks and multiple activities," *Nature Reviews Cancer*, vol. 9, no. 6. Nature Publishing Group, pp. 400–414, 2009.
- [53] abcam, "p21 in apoptosis: tools and targets | Abcam," 2019. [Online]. Available: <https://www.abcam.com/reagents/p21-in-apoptosis-tools-and-targets>. [Accessed: 05-Jul-2020].
- [76] Albers M.B., J. Manoharan, and D. K. Bartsch, "Contemporary surgical management of the Zollinger-Ellison syndrome in multiple endocrine neoplasia type 1," *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 33, no. 5. Bailliere Tindall Ltd, 01-Oct-2019.
- [124] Amand M. M., J. A. Hanover, and J. Shiloach, "A comparison of strategies for immortalizing mouse embryonic fibroblasts," *J. Biol. Methods*, vol. 3, no. 2, p. 41, May 2016.
- [98] Amand M. M., J. A. Hanover, and J. Shiloach, "A comparison of strategies for immortalizing mouse embryonic fibroblasts," *J. Biol. Methods*, vol. 3, no. 2, p. 41, May 2016.
- [178] Aoshiba K et al., "Role of p38-mitogen-activated protein kinase in spontaneous apoptosis of human neutrophils - PubMed," *J. Immunol.*, p. 1692, 1999.
- [14] Apte W. J. MV, Pirola RC, "Stellate Cells in Health and Disease," in *Pancreatic Stellate Cells*, E. Inc., Ed. Chandrashekar R. Ghandi, Massimo Pizani, 2015, pp. 271–310.
- [107] Aristizabal E. T. Prada and C. J. Auernhammer, "Targeted therapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: Preclinical strategies and future targets," *Endocrine Connections*, vol. 7, no. 1. BioScientifica Ltd., pp. R1–R25, 01-Jan-2018.
- [117] Aubrey B. J., G. L. Kelly, A. Janic, M. J. Herold, and A. Strasser, "How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?," *Cell Death and Differentiation*, vol. 25, no. 1. Nature Publishing Group, pp. 104–113, 2018.
- [118] Baran K., I. Voskoboinik, N. J. Waterhouse, V. R. Sutton, and J. A. Trapani, "Cytotoxic granules house potent proapoptotic toxins critical for antiviral responses and immune homeostasis," in *Apoptosis: Physiology and Pathology*, Cambridge University Press, 2011, pp. 106–122.
- [41] Bartsch D. K. and M. B. Albers, "Controversies in surgery for multiple endocrine neoplasia type 1-associated Zollinger–Ellison syndrome," *Int. J. Endocr. Oncol.*, vol. 2, no. 4, pp. 263–271, Nov. 2015.
- [191] Bartsch D.K., "neuroendokrine pankreastumore," 2019. [Online]. Available: <http://www.neuroendokrine-pankreastumore.de/>. [Accessed: 04-Jul-2020].
- [40] Baud V. and M. Karin, "Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives," *Trends in Cell Biology*, vol. 11, no. 9. Trends Cell Biol, pp. 372–377, 2001.
- [16] Baumgartner-Parzer S., "Multiple endocrine neoplasia 1 (MEN1): (OMIM 131100)," *Austrian J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 11, no. 4, pp. 134–135, Dec. 2018.
- [92] Bazzi W. et al., "MEN1 Missense Mutations Impair Sensitization to Apoptosis Induced by Wild-Type Menin in Endocrine Pancreatic Tumor Cells," *Gastroenterology*, vol. 135, no. 5, 2008.
- [31] Bazzi W. et al., "MEN1 Missense Mutations Impair Sensitization to Apoptosis Induced by Wild-Type Menin in Endocrine Pancreatic Tumor Cells," *Gastroenterology*, vol. 135, no. 5, 2008.
- [131] Belmokhtar C. A., J. Hillion, and E. Ségal-Bendirdjian, "Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms," *Oncogene*, vol. 20, no. 26, pp. 3354–3362, Jun. 2001.
- [184] Bender L. M., M. J. Morgan, L. R. Thomas, Z. G. Liu, and A. Thorburn, "The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm," *Cell Death Differ.*, vol. 12, no. 5, pp. 473–481, May 2005.
- [187] Benten D. et al., "Establishment of the first well-differentiated human pancreatic neuroendocrine tumor model," *Mol. Cancer Res.*, vol. 16, no. 3, pp. 496–507, Mar. 2018.
- [188] Brentnall M., L. Rodriguez-Menocal, R. L. De Guevara, E. Cepero, and L. H. Boise, "Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis," *BMC Cell Biol.*, vol. 14, no. 1, Jul. 2013.
- [20] Brouckaert G., M. Kalai, X. Saelens, and P. Vandenabeele, "Apoptotic pathways and their regulation," in *Apoptotic Pathways as Targets for Novel Therapies in Cancer and Other Diseases*, Springer US, 2005, pp. 1–29.
- [102] Bunz F. et al., "Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage," *Science (80-.)*, vol. 282, no. 5393, pp. 1497–1501, Nov. 1998.

- [30] Busquets J. *et al.*, "Surgical Treatment of Non-Functioning Pancreatic Neuroendocrine Tumours Based on Three Clinical Scenarios," *Cirugía Española (English Ed.)*, vol. 94, no. 10, pp. 578–587, Dec. 2016.
- [10] Caspase and Proteasome Activity during Staurosporin-Induced Apoptosis in Lens Epithelial Cells | IOVS | ARVO Journals. [Online]. Available: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2162654>. [Accessed: 03-Nov-2020].
- [52] Caspasen – Wikipedia, *Wikipedia*, 2020. [Online]. Available: <https://de.wikipedia.org/wiki/Caspasen>. [Accessed: 05-Jul-2020].
- [48] Cavallaro S., "Cracking the code of neuronal apoptosis and survival," *Cell Death Dis.*, vol. 6, Nov. 1963.
- [70] Chae H. J. *et al.*, "Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts," *Pharmacol. Res.*, vol. 42, no. 4, pp. 373–381, Oct. 2000.
- [27] Chan C. S. *et al.*, "ATRX, DAXX or MEN1 mutant pancreatic neuroendocrine tumors are a distinct alpha-cell signature subgroup," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, p. 4158, Dec. 2018.
- [28] Chandrasekharappa S. C. *et al.*, "Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1," *Science (80-.)*, vol. 276, no. 5311, pp. 404–406, Apr. 1997.
- [15] Chen G. and D. V. Goeddel, "TNF-R1 signaling: A beautiful pathway," *Science*, vol. 296, no. 5573, pp. 1634–1635, 31-May-2002.
- [61] Childs B.G., M. Durik, D. J. Baker, and J. M. Van Deursen, "Cellular senescence in aging and age-related disease: From mechanisms to therapy," *Nature Medicine*, vol. 21, no. 12. Nature Publishing Group, pp. 1424–1435, 08-Dec-2015.
- [24] Chinnaiyan A.M. *et al.*, "FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 9, pp. 4961–4965, Mar. 1996.
- [156] CHOMZYNSKI P., "Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction," *Anal. Biochem.*, vol. 162, no. 1, pp. 156–159, Apr. 1987.
- [15] Cloyd J. M. and G. A. Poultides, "Non-functional neuroendocrine tumors of the pancreas: Advances in diagnosis and management," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 21, no. 32. WJG Press, pp. 9512–9525, 28-Aug-2015.
- [4] Cohen J. J., R. C. Duke, V. A. Fadok, and K. S. Sellins, "Apoptosis and programmed cell death in immunity," *Annual Review of Immunology*, vol. 10. Annu Rev Immunol, pp. 267–293, 1992.
- [132] Costa E. C., D. de Melo-Diogo, A. F. Moreira, M. P. Carvalho, and I. J. Correia, "Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches," *Biotechnology Journal*, vol. 13, no. 1. Wiley-VCH Verlag, 01-Jan-2018.
- [78] Crabtree J. S. *et al.*, "A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 3, pp. 1118–1123, Jan. 2001.
- [75] Detailed Information [JCRB0183]. [Online]. Available: https://cellbank.nibiohn.go.jp/~cellbank/en/search_res_det.cgi?ID=2018. [Accessed: 08-Nov-2020].
- [38] Devireddy L. R. and M. R. Green, "Transcriptional Program of Apoptosis Induction following Interleukin 15 Deprivation: Identification of RC3, a Calcium/Calmodulin Binding Protein, as a Novel Proapoptotic Factor," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 13, pp. 4532–4541, Jul. 2003.
- [83] Dhanasekaran D. N. and E. P. Reddy, "JNK signaling in apoptosis," *Oncogene*, vol. 27, no. 48. Oncogene, pp. 6245–6251, 20-Oct-2008.
- [36] Dickens L. S. *et al.*, "A Death Effector Domain Chain DISC Model Reveals a Crucial Role for Caspase-8 Chain Assembly in Mediating Apoptotic Cell Death," *Mol. Cell*, vol. 47, no. 2, pp. 291–305, Jul. 2012.
- [103] Doc Check Medical Service, "TERT - DocCheck Flexikon," 2019. [Online]. Available: <https://flexikon.doccheck.com/de/TERT>. [Accessed: 15-Jul-2020].
- [33] Dotto G. P. "p21(WAF1/Cip1): More than a break to the cell cycle?," *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1471, no. 1, Jul. 2000.
- [104] Durkin M., X. Qian, N. Popescu, and D. Lowy, "Isolation of Mouse Embryo Fibroblasts," *BIO-PROTOCOL*, vol. 3, no. 18, 2013.
- [37] Ehrlich L., C. Hall, F. Meng, T. Lairmore, G. Alpini, and S. Glaser, "A review of the scaffold protein menin and its role in hepatobiliary pathology," *Gene Expression*, vol. 17, no. 3. Cognizant Communication Corporation, pp. 251–263, 2017.

- [55] El-Deiry W. S. *et al.*, "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression," *Cell*, vol. 75, no. 4, pp. 817–825, Nov. 1993.
- [111] Ellis R. E., J. Yuan, and H. R. Horvitz, "Mechanisms and functions of cell death," *Annual Review of Cell Biology*, vol. 7. Annu Rev Cell Biol, pp. 663–698, 1991.
- [99] Elmore S., "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death," *Toxicologic Pathology*, vol. 35, no. 4. Toxicol Pathol, pp. 495–516, 2007.
- [193] Erkan M. *et al.*, "StellaTUM: Current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research," *Gut*, vol. 61, no. 2. BMJ Publishing Group, pp. 172–178, 01-Feb-2012.
- [143] Evers B. M. *et al.*, "Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth," *Gastroenterology*, vol. 101, no. 2, pp. 303–311, 1991.
- [159] Fendrich V. *et al.*, "Snail and Sonic Hedgehog activation in neuroendocrine tumors of the ileum," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 14, no. 3, pp. 865–874, Sep. 2007.
- [112] Fischer R., T. Baumert, and H. E. Blum, "Hepatitis C virus infection and apoptosis," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 13, no. 36. WJG Press, pp. 4865–4872, 28-Sep-2007.
- [18] flexitube sirna - GeneGlobe. [Online]. Available: <https://geneglobe.qiagen.com/product-groups/flexitube-sirna>. [Accessed: 18-Nov-2020].
- [185] Fracasso P. M. *et al.*, "A Phase 1 study of UCN-01 in combination with irinotecan in patients with resistant solid tumor malignancies," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 67, no. 6, pp. 1225–1237, Jun. 2011.
- [144] Frost M., K. E. Lines, and R. V. Thakker, "Current and emerging therapies for PNETS in patients with or without MEN1," *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 14, no. 4. Nature Publishing Group, pp. 216–227, 01-Apr-2018.
- [51] Fuchs Y. and H. Steller, "Live to die another way: Modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 16, no. 6. Nature Publishing Group, pp. 329–344, 22-May-2015.
- [137] Fuentes-Prior P. and G. S. Salvesen, "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition," *Biochemical Journal*, vol. 384, no. 2. Biochem J, pp. 201–232, 01-Dec-2004.
- [113] Gallagher S. R. and P. R. Desjardins, "Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy," *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, vol. 76, no. 1, Oct. 2006.
- [198] Gen S. W. and Z. Ding, "Caspase 9 is required for p53-dependent apoptosis and chemosensitivity in a human ovarian cancer cell line," *Oncogene*, vol. 21, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2002.
- [133] Getz A.M., F. Xu, F. Visser, R. Persson, and N. I. Syed, "Tumor suppressor menin is required for subunit-specific nAChR $\alpha 5$ transcription and nAChR-dependent presynaptic facilitation in cultured mouse hippocampal neurons," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017.
- [170] Gibril F., M. Schumann, A. Pace, and R. T. Jensen, "Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 and Zollinger-Ellison Syndrome: A Prospective Study of 107 Cases and Comparison with 1009 Cases from the Literature," *Medicine (Baltimore)*, vol. 83, no. 1, pp. 43–83, Jan. 2004.
- [172] Gobl A.E., Berg M., Lopez-Egido J.R., Öberg K., Skogseid B., and Westin G., "Menin represses JunD-activated transcription by a histone deacetylase-dependent mechanism," *Biochim. Biophys. Acta – Gene Struct. Expr.*, vol. 1447, no. 1, pp. 51–56, Oct. 1999.
- [5] Gregory C. D. and A. Devitt, "The macrophage and the apoptotic cell: An innate immune interaction viewed simplistically?," *Immunology*, vol. 113, no. 1. Immunology, pp. 1–14, Sep-2004.
- [49] Gutierrez L., M. Mauriat, J. Pelloux, C. Bellini, and O. Van Wuytswinkel, "Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR," *Plant Cell*, vol. 20, no. 7. American Society of Plant Biologists, pp. 1734–1735, Jul-2008.
- [2] H. I. K. A. Iguchi H., "A Somatostatin-Secreting Cell Line Established From a Human Pancreatic Islet Cell Carcinoma (Somatostatinoma): Release Experiment and Immunohistochemical Study," *Cancer Res.*, pp. 3691–3, 1990.

- H. I. K. A. Iguchi H, "A Somatostatin-Secreting Cell Line Established From a Human Pancreatic Islet Cell Carcinoma (Somatostatinoma): Release Experiment and Immunohistochemical Study," *Cancer Research*, 1990.
- [21] Harper J. W. *et al.*, "Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21," *Mol. Biol. Cell*, vol. 6, no. 4, pp. 387–400, 1995.
- [100] Hashimoto I. M. M, Kyo S, Hua X, Tahara H, Nakajima M, Takakura M, Sakaguchi J, Maida Y, Nakamura M, Ikoma T, Mizumoto Y, "Role of menin in the regulation of telomerase activity in normal and cancer cells - PubMed," *Int J Oncol.*, vol. 33, no. 2, pp. 333–40, 2008.
- [58] Healy R. L. L, *Atlas of Human Pluripotent Stem Cells in Culture*, 1st ed. 2015.
- [59] Hendy G. N., H. Kaji, and L. Canaff, "Cellular functions of menin," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 668, pp. 37–50, 2009.
- [85] Hill J. M. *et al.*, "Identification of an Expanded Binding Surface on the FADD Death Domain Responsible for Interaction with CD95/Fas," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 2, pp. 1474–1481, Jan. 2004.
- [67] Hill M. M., M. Andjelkovic, D. P. Brazil, S. Ferrari, D. Fabbro, and B. A. Hemmings, "Insulin-stimulated Protein Kinase B Phosphorylation on Ser-473 is Independent of Its Activity and Occurs through a Staurosporine-insensitive Kinase," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 28, pp. 25643–25646, Jul. 2001.
- [145] Hofving T. *et al.*, "The neuroendocrine phenotype, genomic profile and therapeutic sensitivity of GEPNET cell lines," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 25, no. 3, pp. 367–380, Mar. 2018.
- [54] Hofving T. *et al.*, "The neuroendocrine phenotype, genomic profile and therapeutic sensitivity of GEPNET cell lines," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 25, no. 3, pp. 367–380, Mar. 2018.
- [79] Hsu H., H. B. Shu, M. G. Pan, and D. V. Goeddel, "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways," *Cell*, vol. 84, no. 2, pp. 299–308, Jan. 1996.
- [119] Hu W. *et al.*, "Gene amplifications in well-differentiated pancreatic neuroendocrine Tumors inactivate the p53 Pathway," *Genes and Cancer*, vol. 1, no. 4, pp. 360–368, 2010.
- [179] Hu W. *et al.*, "Gene amplifications in well-differentiated pancreatic neuroendocrine Tumors inactivate the p53 Pathway," *Genes and Cancer*, vol. 1, no. 4, pp. 360–368, 2010.
- [180] Human primary cells versus cell lines: differences and advantages | PromoCell. [Online]. Available: <https://www.promocell.com/in-the-lab/human-primary-cells-and-immortal-cell-lines/>. [Accessed: 08-Nov-2020].
- [57] Igaz P., "MEN1 Clinical Background," in *SuperMEN1: Pituitary, Parathyroid and Pancreas*, vol. 668, A. P. Katalin Balogh, Ed. Adv Exp Med Biol, 2009, pp. 1–15.
- [189] Iguchi H., I. Hayashi, and A. Kono, "A Somatostatin-secreting Cell Line Established from a Human Pancreatic Islet Cell Carcinoma (Somatostatinoma): Release Experiment and Immunohistochemical Study1," 1990.
- [190] Inzani F., G. Petrone, and G. Rindi, "The New World Health Organization Classification for Pancreatic Neuroendocrine Neoplasia," *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, vol. 47, no. 3. W.B. Saunders, pp. 463–470, 01-Sep-2018.
- [65] Ishizuka J., A. C. Hsieh, C. M. Townsend, and J. C. Thompson, "Effect of 5-HT3 receptor antagonist (ondansetron) on functioning human pancreatic carcinoid cells," *Surg. Oncol.*, vol. 2, no. 4, pp. 221–225, 1993.
- [135] Iyer S. and S. K. Agarwal, "Epigenetic regulation in the tumorigenesis of MEN1-associated endocrine cell types," *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 61, no. 1. BioScientifica Ltd., pp. R13–R24, 01-Jul-2018.
- [60]

- H. I. K. A. Iguchi H, "A Somatostatin-Secreting Cell Line Established From a Human Pancreatic Islet Cell Carcinoma (Somatostatinoma): Release Experiment and Immunohistochemical Study," *Cancer Research*, 1990.
- [21] Harper J. W. *et al.*, "Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21," *Mol. Biol. Cell*, vol. 6, no. 4, pp. 387–400, 1995.
- [100] Hashimoto I. M. M, Kyo S, Hua X, Tahara H, Nakajima M, Takakura M, Sakaguchi J, Maida Y, Nakamura M, Ikoma T, Mizumoto Y, "Role of menin in the regulation of telomerase activity in normal and cancer cells - PubMed," *Int J Oncol.*, vol. 33, no. 2, pp. 333–40, 2008.
- [58] Healy R. L. L, *Atlas of Human Pluripotent Stem Cells in Culture*, 1st ed. 2015.
- [59] Hendy G. N., H. Kaji, and L. Canaff, "Cellular functions of menin," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 668, pp. 37–50, 2009.
- [85] Hill J. M. *et al.*, "Identification of an Expanded Binding Surface on the FADD Death Domain Responsible for Interaction with CD95/Fas," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 2, pp. 1474–1481, Jan. 2004.
- [67] Hill M. M., M. Andjelkovic, D. P. Brazil, S. Ferrari, D. Fabbro, and B. A. Hemmings, "Insulin-stimulated Protein Kinase B Phosphorylation on Ser-473 is Independent of Its Activity and Occurs through a Staurosporine-insensitive Kinase," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 28, pp. 25643–25646, Jul. 2001.
- [145] Hofving T. *et al.*, "The neuroendocrine phenotype, genomic profile and therapeutic sensitivity of GEPNET cell lines," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 25, no. 3, pp. 367–380, Mar. 2018.
- [54] Hofving T. *et al.*, "The neuroendocrine phenotype, genomic profile and therapeutic sensitivity of GEPNET cell lines," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 25, no. 3, pp. 367–380, Mar. 2018.
- [79] Hsu H., H. B. Shu, M. G. Pan, and D. V. Goeddel, "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways," *Cell*, vol. 84, no. 2, pp. 299–308, Jan. 1996.
- [119] Hu W. *et al.*, "Gene amplifications in well-differentiated pancreatic neuroendocrine Tumors inactivate the p53 Pathway," *Genes and Cancer*, vol. 1, no. 4, pp. 360–368, 2010.
- [179] Hu W. *et al.*, "Gene amplifications in well-differentiated pancreatic neuroendocrine Tumors inactivate the p53 Pathway," *Genes and Cancer*, vol. 1, no. 4, pp. 360–368, 2010.
- [180] Human primary cells versus cell lines: differences and advantages | PromoCell. [Online]. Available: <https://www.promocell.com/in-the-lab/human-primary-cells-and-immortal-cell-lines/>. [Accessed: 08-Nov-2020].
- [57] Igaz P., "MEN1 Clinical Background," in *SuperMEN1: Pituitary, Parathyroid and Pancreas*, vol. 668, A. P. Katalin Balogh, Ed. Adv Exp Med Biol, 2009, pp. 1–15.
- [189] Iguchi H., I. Hayashi, and A. Kono, "A Somatostatin-secreting Cell Line Established from a Human Pancreatic Islet Cell Carcinoma (Somatostatinoma): Release Experiment and Immunohistochemical Study1," 1990.
- [190] Inzani F., G. Petrone, and G. Rindi, "The New World Health Organization Classification for Pancreatic Neuroendocrine Neoplasia," *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, vol. 47, no. 3. W.B. Saunders, pp. 463–470, 01-Sep-2018.
- [65] Ishizuka J., A. C. Hsieh, C. M. Townsend, and J. C. Thompson, "Effect of 5-HT3 receptor antagonist (ondansetron) on functioning human pancreatic carcinoid cells," *Surg. Oncol.*, vol. 2, no. 4, pp. 221–225, 1993.
- [135] Iyer S. and S. K. Agarwal, "Epigenetic regulation in the tumorigenesis of MEN1-associated endocrine cell types," *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 61, no. 1. BioScientifica Ltd., pp. R13–R24, 01-Jul-2018.
- [60]

- JCRB Cell Bank (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank), "[JCRB0183]-QGP-1," 2015. [Online]. Available: https://cellbank.nibiohn.go.jp/~cellbank/en/search_res_det.cgi?ID=2018. [Accessed: 12-Jul-2020].
- [50] Jensen R. T. and J. A. Norton, "Treatment of pancreatic neuroendocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1 some clarity but continued controversy," *Pancreas*, vol. 46, no. 5. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 589–594, 2017.
- [74] Jensen R. T. and J. A. Norton, "Treatment of pancreatic neuroendocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1 some clarity but continued controversy," *Pancreas*, vol. 46, no. 5. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 589–594, 2017.
- [161] Jensen R. T., M. J. Berna, D. B. Bingham, and J. A. Norton, "Inherited pancreatic endocrine tumor syndromes: Advances in molecular pathogenesis, diagnosis, management, and controversies," *Cancer*, vol. 113, no. 7. Cancer, pp. 1807–1843, 01-Oct-2008.
- [91] Jiang Z., B. Xing, Z. Feng, J. Ma, X. Ma, and X. Hua, "Menin Upregulates FOXO1 Protein Stability by Repressing Skp2-Mediated Degradation in β Cells," *Pancreas*, vol. 48, no. 2, pp. 267–274, Feb. 2019.
- [148] Jiang Z., B. Xing, Z. Feng, J. Ma, X. Ma, and X. Hua, "Menin Upregulates FOXO1 Protein Stability by Repressing Skp2-Mediated Degradation in β Cells," *Pancreas*, vol. 48, no. 2, pp. 267–274, Feb. 2019.
- [149] Jiao Y. *et al.*, "DAXX/ATR, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors," *Science (80-.)*, vol. 331, no. 6021, pp. 1199–1203, Mar. 2011.
- [150] Jin S. *et al.* Mao H, Schnepf RW, "Menin Associates with FANCD2, a Protein Involved in Repair of DNA Damage | Cancer Research," *Cancer Res.*, pp. 4204–4210, 2003.
- [207] Jin S. *et al.*, "Menin associates with FANCD2, a protein involved in repair of DNA damage," *Cancer Res.*, vol. 63, no. 14, pp. 4204–4210, Jul. 2003.
- [208] Jin X. F., G. Spöttl, J. Maurer, S. Nölting, and C. J. Auernhammer, "Inhibition of wnt/ β -catenin signaling in neuroendocrine tumors in vitro: Antitumoral effects," *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 2, Feb. 2020.
- [199] Jozefczuk J., K. Drews, and J. Adjaye, "Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells," *J. Vis. Exp.*, no. 64, pp. 1–5, Jun. 2012.
- [42] Kaku *et al.*, "1980 Establishment of a Carcinoembryonic Antigen-Producing Cell Line From Human Pancreatic Carcinoma," pp. 596–601, 1980.
- [162] Kaku M. *et al.*, "Establishment of a Carcinoembryonic Antigen-Producing Cell Line From Human Pancreatic Carcinoma - PubMed," *Gann*, pp. 596–601, 1980.
- [194] Kaku M., T. Nishiyama, K. Yagawa, and M. Abe, "ESTABLISHMENT OF A CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN-PRODUCING CELL LINE FROM HUMAN PANCREATIC CARCINOMA," The Japanese Cancer Association, Oct. 1980.
- [44] Kaltschmidt B., C. Kaltschmidt, T. G. Hofmann, S. P. Hehner, W. Dröge, and M. L. Schmitz, "The pro- or anti-apoptotic function of NF- κ B is determined by the nature of the apoptotic stimulus," *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 12, pp. 3828–3835, 2000.
- [43] Karaman M. W. *et al.*, "A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity," *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, no. 1, pp. 127–132, Jan. 2008.
- [114] Karges W., L. Schaaf, H. Dralle, and B. O. Boehm, "Clinical and molecular diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 1," *Langenbeck's Archives of Surgery*, vol. 386, no. 8. Langenbecks Arch Surg, pp. 547–552, 2002.
- [17] Karimian A., Y. Ahmadi, and B. Yousefi, "Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage," *DNA Repair*, vol. 42. Elsevier B.V., pp. 63–71, 01-Jun-2016.
- [129] Kerr J. F. R., A. H. Wyllie, and A. R. Currie, "Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics," *Br. J. Cancer*, vol. 26, no. 4, pp. 239–257, 1972.
- [192] Kim J. T., C. Liu, Y. Y. Zaytseva, H. L. Weiss, C. M. Townsend, and B. M. Evers, "Neurotensin, a novel target of Wnt/ β -catenin pathway, promotes growth of neuroendocrine tumor cells," *Int. J. Cancer*, vol. 136, no. 6, pp. 1475–1481, Mar. 2015.
- [3] Kim JT *et al.*, "Deregulation of Wnt/ β -catenin Signaling Through Genetic or Epigenetic Alterations in Human Neuroendocrine Tumors - PubMed," *Carcinogenesis*, 2013. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23354304/>. [Accessed: 06-Jul-2020].
- [72] Kischkel FC *et al.* Hellbardt S, Behrmann I, "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated Proteins Form a Death-Inducing Signaling Complex (DISC) With the Receptor – PubMed," *EMBO J*, 1995. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8521815/>. [Accessed: 05-Jul-2020].
- [84] Koo J. H., S. Wang, N. N. Kang, S. J. Hur, and Y. Y. Bahk, "Induction of MAP kinase phosphatase through Erk/MAP kinase activation in three oncogenic Ras (H-, K- and N-Ras)-expressing NIH/3T3 mouse embryonic fibroblast cell lines," *BMB Rep.*, vol. 49, no. 7, pp. 370–375, 2016.
- [45] Kottmann M. C. and A. E. Bale, "Characterization of DNA damage-dependent cell cycle checkpoints in a menin-deficient model," *DNA Repair (Amst)*, vol. 8, no. 8, pp. 944–952, Aug. 2009.
- [46] Krammer P. H., "Apoptose," *Dtsch Arztebl*, 2000. [Online]. Available: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/23461/Apoptose>. [Accessed: 04-Jul-2020].
- [73]

- Krause K. H., C. van Delden, E. Huggler, A. Monod, and D. P. Lew, "Differential effects on neutrophil activation of staurosporin and its protein kinase C-selective derivative cgp 41231," *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.*, vol. 227, no. 2, pp. 221–224, Oct. 1992.
- [109] Kumar S., M. S. Tomar, and A. Acharya, "Activation of p53-dependent/-independent pathways of apoptotic cell death by chelerythrine in a murine T cell lymphoma," *Leuk. Lymphoma*, vol. 56, no. 6, pp. 1846–1855, Jun. 2015.
- [94] Kummer J. L., P. K. Rao, and K. A. Heidenreich, "Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 33, pp. 20490–20494, Aug. 1997.
- [163] Kurata S. I., "Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 31, pp. 23413–23416, Aug. 2000.
- [77] La P. *et al.*, "Menin-mediated caspase 8 expression in suppressing multiple endocrine neoplasia type 1," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 43, pp. 31332–31340, Oct. 2007.
- [160] Laborjournal online: Methoden - Apoptosenachweis mit der Apo-qPCR. [Online]. Available: <https://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v129.php>. [Accessed: 01-Nov-2020].
- [136] Lane D. P., "p53, guardian of the genome," *Nature*, vol. 358, no. 6381, pp. 15–16, 1992.
- [106] Lau J. Y. N., X. Xie, M. M. C. Lai, and P. C. Wu, "Apoptosis and viral hepatitis," *Semin. Liver Dis.*, vol. 18, no. 2, pp. 169–176, 1998.
- Lemos M. C. and R. V. Thakker, "Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): Analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene," *Hum. Mutat.*, vol. 29, no. 1, pp. 22–32, Jan. 2008.
- [35] [88] Levis M., "Midostaurin approved for FLT3-mutated AML," *Blood*, vol. 129, no. 26, pp. 3403–3406, Jun. 2017.
- Li J. W. Y., X. Hua, D. Reidy-Lagunes, and B. R. Untch, "MENIN loss as a tissue-specific driver of tumorigenesis," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 469, Elsevier Ireland Ltd, pp. 98–106, 05-Jul-2018.
- [110] [115] Li X. *et al.*, "Clinical implication of MEN1 mutation in surgically resected thymic carcinoid patients," *J. Thorac. Dis.*, vol. 10, no. 2, pp. E125–E129, Feb. 2018.
- [86] Lin X. *et al.*, "Frs2 α is essential for the fibroblast growth factor to regulate the mTOR pathway and autophagy in mouse embryonic fibroblasts," *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 7, no. 8, pp. 1114–1121, 2011.
- [195] Lines K. E. *et al.*, "Epigenetic pathway inhibitors represent potential drugs for treating pancreatic and bronchial neuroendocrine tumors," *Oncogenesis*, vol. 6, no. 5, 2017.
- [196] Livak K. J. and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
- [93] Lluis J. M. *et al.*, "TAK1 is required for survival of mouse fibroblasts treated with TRAIL, and does so by NF- κ B dependent induction of cFLIPL," *PLoS One*, vol. 5, no. 1, Jan. 2010.
- [95] Lopez-Bergami Z. R. P., "Apoptosis: Physiology and Pathology - Douglas R. Green – Google Books," in *Apoptosis: Physiology and Pathology*, J. C. Reed, Ed. 2011, pp. 74–82.
- [80] Lovell J. F. *et al.*, "Membrane Binding by tBid Initiates an Ordered Series of Events Culminating in Membrane Permeabilization by Bax," *Cell*, vol. 135, no. 6, pp. 1074–1084, Dec. 2008.
- [209] Lucas M., "The Role of C-type Protein Kinases in Apoptosis," Springer, Berlin, Heidelberg, 2000, pp. 109–126.
- [7] Mafficini A. and A. Scarpa, "Genetics and epigenetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms," *Endocrine Reviews*, vol. 40, no. 2, Oxford University Press, pp. 506–536, 2019.
- [71] Manns J. *et al.*, "Triggering of a novel intrinsic apoptosis pathway by the kinase inhibitor staurosporine: activation of caspase-9 in the absence of Apaf-1," *FASEB J.*, vol. 25, no. 9, pp. 3250–3261, Sep. 2011.
- [116] Manoharan J. *et al.*, "Is Routine Screening of Young Asymptomatic MEN1 Patients Necessary?," *World J. Surg.*, vol. 41, no. 8, pp. 2026–2032, Aug. 2017.
- [81] Marinoni I. *et al.*, "Loss of DAXX and ATRX are associated with chromosome instability and reduced survival of patients with pancreatic neuroendocrine tumors," *Gastroenterology*, vol. 146, no. 2, 2014.
- [82] Masamune A., K. Kikuta, M. Satoh, K. Satoh, and T. Shimosegawa, "Rho kinase inhibitors block activation of pancreatic stellate cells," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 140, no. 7, pp. 1292–1302, Dec. 2003.

- [68] Matkar S., A. Thiel, and X. Hua, "Menin: A scaffold protein that controls gene expression and cell signaling," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 38, no. 8. Trends Biochem Sci, pp. 394–402, Aug-2013.
- [8] Matrood S. *et al.*, "Modulation of pancreatic neuroendocrine neoplastic cell fate by autophagy mediated death," *Neuroendocrinology*, Oct. 2020.
- [164] MCGahren-Murray M. and K. Keyomarsi, "Staurosporine," in *Encyclopedia of Cancer*, Springer Berlin Heidelberg, 2011, pp. 3503–3506.
- [165] Metzger C.E., "Apoptose-Story: Die zelluläre Kunst des Sterbens - wissenschaft.de," *bild der wissenschaft*, 2000. [Online]. Available: <https://www.wissenschaft.de/umwelt-natur/apoptose-story-die-zellulaere-kunst-des-sterbens/>. [Accessed: 04-Jul-2020].
- [120] Morse D. L., D. Carroll, L. Weberg, M. C. Borgstrom, J. Ranger-Moore, and R. J. Gillies, "Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction," *Anal. Biochem.*, vol. 342, no. 1, pp. 69–77, Jul. 2005.
- [29] Müller M. *et al.*, "p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs," *J. Exp. Med.*, vol. 188, no. 11, pp. 2033–2045, Dec. 1998.
- [32] Mullis K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich, "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction," *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, vol. 51, no. 1, pp. 263–273, 1986.
- [121] Nakamura-López Y., R. E. Sarmiento-Silva, J. Moran-Andrade, and B. Gómez-García, "Staurosporine-induced apoptosis in P388D1 macrophages involves both extrinsic and intrinsic pathways," *Cell Biol. Int.*, vol. 33, no. 9, pp. 1026–1031, Sep. 2009.
- [96] Nell S. *et al.*, "Management of MEN1 Related Nonfunctioning Pancreatic NETs: A Shifting Paradigm: Results from the DutchMEN1 Study Group," *Ann. Surg.*, vol. 267, no. 6, pp. 1155–1160, Jun. 2018.
- [200] Nölting S. *et al.*, "The selective PI3K α inhibitor BYL719 as a novel therapeutic option for neuroendocrine tumors: Results from multiple cell line models," *PLoS One*, vol. 12, no. 8, Aug. 2017.
- [166] Norton J.A., G. Krampitz, and R. T. Jensen, "Multiple Endocrine Neoplasia: Genetics and Clinical Management.," *Surgical Oncology Clinics of North America*, vol. 24, no. 4. W.B. Saunders, pp. 795–832, 01-Oct-2015.
- [167] Oda E. *et al.*, "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis," *Science (80-.)*, vol. 288, no. 5468, pp. 1053–1058, May 2000.
- [69] Öhlund D. *et al.*, "Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer," *J. Exp. Med.*, vol. 214, no. 3, pp. 579–596, Mar. 2017.
- [39] OMIM® and Online Mendelian Inheritance in Man®, "OMIM Entry - * 116899 - CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 1A; CDKN1A," 2016. [Online]. Available: <https://omim.org/entry/116899>. [Accessed: 05-Jul-2020].
- [34] p53 – Wikipedia. [Online]. Available: <https://de.wikipedia.org/wiki/P53>. [Accessed: 04-Nov-2020].
- [130] p53 upregulated modulator of apoptosis - Wikipedia. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/P53_upregulated_modulator_of_apoptosis. [Accessed: 05-Nov-2020].
- [140] Palchaudhuri R. *et al.*, "A Small Molecule that Induces Intrinsic Pathway Apoptosis with Unparalleled Speed," *Cell Rep.*, vol. 13, no. 9, pp. 2027–2036, Dec. 2015.
- [141] Papaconstantinou M. *et al.*, "Menin Is a Regulator of the Stress Response in Drosophila melanogaster," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 22, p. 9960, 2005.
- [146] Papaconstantinou M. *et al.*, "Menin links the stress response to genome stability in drosophila melanogaster," *PLoS One*, vol. 5, no. 11, 2010.
- [122] Park B., A. Abdel-Azeem, M. Al-Sanea, K. Yoo, J. Tae, and S. Lee, "Staurosporine Analogues from Microbial and Synthetic Sources and Their Biological Activities," *Curr. Med. Chem.*, vol. 20, no. 31, pp. 3872–3902, Sep. 2013.
- [123] Pfeffer C. M. and A. T. K. Singh, "Apoptosis: A target for anticancer therapy," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 2. MDPI AG, p. 448, 02-Feb-2018.
- [19] Pitt S. C., H. Chen, and M. Kunnimalaiyaan, "Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/akt signaling suppresses tumor cell proliferation and neuroendocrine marker expression in GI carcinoid tumors," *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 16, no. 10, pp. 2936–2942, Oct. 2009.
- [23] Porcelli A.M., A. Ghelli, C. Zanna, P. Valente, S. Ferroni, and M. Rugolo, "Apoptosis induced by staurosporine in ECV304 cells requires cell shrinkage and upregulation of Cl⁻ conductance," *Cell Death Differ.*, vol. 11, no. 6, pp. 655–662, Jun. 2004.
- [157] Primary Cell - an overview | ScienceDirect Topics. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/primary-cell>. [Accessed: 08-Nov-2020].

- [6] Qiu H. *et al.*, "MEN1 deficiency leads to neuroendocrine differentiation of lung cancer and disrupts the DNA damage response," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, Dec. 2020.
- [142] Razmara M., A. Monazzam, and B. Skogseid, "Reduced menin expression impairs rapamycin effects as evidenced by an increase in mTORC2 signaling and cell migration 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology," *Cell Commun. Signal.*, vol. 16, no. 1, Oct. 2018.
- [63] Roninson I. B., "Oncogenic functions of tumour suppressor p21Waf1/Cip1/Sdi1: Association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts," *Cancer Letters*, vol. 179, no. 1. Cancer Lett, pp. 1–14, 08-May-2002.
- [66] Roulston A., C. Reinhard, P. Amiri, and L. T. Williams, "Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor α ," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 17, pp. 10232–10239, Apr. 1998.
- [9] Salvesen G. S., "Human caspases – Apoptosis and inflammation signaling proteases," in *Apoptosis: Physiology and Pathology*, Cambridge University Press, 2011, pp. 1–10.
- [56] Sanchez V., M. Lucas, A. Sanz, and R. Goberna, "Decreased protein kinase C activity is associated with programmed cell death (apoptosis) in freshly isolated rat hepatocytes," *Biosci. Rep.*, vol. 12, no. 3, pp. 199–206, Jun. 1992.
- [186] Scarpa A. *et al.*, "Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours," *Nature*, vol. 543, no. 7643, pp. 65–71, Mar. 2017.
- [10] Schaaf L. *et al.*, "Die Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1 MEN 1 Ein Ratgeber für Patienten," 2010.
- [105] Schleich K. *et al.*, "Molecular architecture of the DED chains at the DISC: Regulation of procaspase-8 activation by short DED proteins c-FLIP and procaspase-8 prodomain," *Cell Death Differ.*, vol. 23, no. 4, pp. 681–694, Apr. 2016.
- [97] Schneider P. *et al.*, "Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 30, pp. 18827–18833, 1997.
- [138] Schnepf R. W. *et al.*, "Menin Induces Apoptosis in Murine Embryonic Fibroblasts," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 11, pp. 10685–10691, Mar. 2004.
- [153] Schnepf R. W. *et al.*, "Menin Induces Apoptosis in Murine Embryonic Fibroblasts," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 11, pp. 10685–10691, Mar. 2004.
- [154] Schott M., G. Klöppel, A. Raffel, A. Saleh, W. T. Knoefel, and W. A. Scherbaum, "Gastroenteropankreatische neuroendokrine neoplasien," *Deutsches Arzteblatt*, vol. 108, no. 18. pp. 305–312, 06-May-2011.
- [125] Shangary S., C. L. Oliver, and D. E. Johnson, "The intrinsic (mitochondrial) death pathway and new cancer therapeutics: Bcl-2 family in focus," in *Apoptotic Pathways as Targets for Novel Therapies in Cancer and Other Diseases*, Springer US, 2005, pp. 107–135.
- [171] SIB Swiss Institute of Bioinformatics, "Cellosaurus cell line HPSC-TAg (CVCL_SA57)," 2018. [Online]. Available: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_SA57. [Accessed: 12-Jul-2020].
- [174] SIB Swiss Institute of Bioinformatics, "Cellosaurus cell line QGP-1 (CVCL_3143)," 2019. [Online]. Available: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_3143. [Accessed: 06-Jul-2020].
- [175] Simon R., Babette; Bartsch, Detlef; Rieder, Harald; Joseph, Klaus; Rothmund, Matthias; Arnold, "Multiple endokrine Neoplasie Typ 1: Stand der Diagnostik und Tumorprävention," *Dtsch Arztebl*, vol. 97, no. 11, p. A-698 / B-569 / C-535, 2000.
- [147] Sluyser M., "Application of apoptosis to cancer treatment," in *Application of Apoptosis to Cancer Treatment*, Dordrecht: Springer Netherlands, 2005, pp. 0–370.
- [126] Staurosporin – Wikipedia. [Online]. Available: <https://de.wikipedia.org/wiki/Staurosporin>. [Accessed: 03-Nov-2020].
- [176] Staurosporine - Wikipedia. [Online]. Available: <https://en.wikipedia.org/wiki/Staurosporine>. [Accessed: 14-Nov-2020].
- [177] Stennicke H. R. *et al.*, "Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 42, pp. 27084–27090, Oct. 1998.
- [64] Stepczynska A. *et al.*, "Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation," *Oncogene*, vol. 20, no. 10, pp. 1193–1202, Mar. 2001.
- [11] Stevenson M., K. E. Lines, and R. V. Thakker, "Molecular Genetic Studies of Pancreatic Neuroendocrine Tumors: New Therapeutic Approaches," *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, vol. 47, no. 3. W.B. Saunders, pp. 525–548, 01-Sep-2018.
- [127] Stevenson M., K. E. Lines, and R. V. Thakker, "Molecular Genetic Studies of Pancreatic Neuroendocrine Tumors: New Therapeutic Approaches," *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, vol. 47, no. 3. W.B. Saunders, pp. 525–548, 01-Sep-2018.

- [128] Suzuki A., Y. Tsutomi, K. Akahane, T. Araki, and M. Miura, "Resistance to Fas-mediated apoptosis: Activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21(WAF1) and IAP gene family ILP," *Oncogene*, vol. 17, no. 8, pp. 931–939, Aug. 1998.
- [12] Tang L. H. *et al.*, "Attenuation of the retinoblastoma pathway in pancreatic neuroendocrine tumors due to increased Cdk4/Cdk6," *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 17, pp. 4612–4620, Sep. 2012.
- [101] Thakker R. V. *et al.*, "Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1)," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 97, no. 9, J Clin Endocrinol Metab, pp. 2990–3
- [151] Thakker R. V., "Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and type 4 (MEN4)," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 386, no. 1–2, Mol Cell Endocrinol, pp. 2–15, 05-Apr-2014.
- [152] Tsukahara K. *et al.*, "Tumor necrosis factor- α mediates antiapoptotic signals partially via p38 MAP kinase activation in human eosinophils," in *International Archives of Allergy and Immunology* 1999, vol. 120, no. SUPPL. 1, pp. 54–59.
- [181] Vandamme T. *et al.*, "Whole-exome characterization of pancreatic neuroendocrine tumor cell lines BON-1 and QGP-1," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 54, no. 2, pp. 137–147, Jan. 2015.
- [182] Vandamme T. *et al.*, "Whole-exome characterization of pancreatic neuroendocrine tumor cell lines BON-1 and QGP-1," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 54, no. 2, pp. 137–147, Jan. 2015.
- [25] Vogt C., "Vogt, Carl :: Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*) . - Solothurn : Jent u. Gassmann, 1842 / [rezensiert von:] Theile - JPortal," *Neue Jenaische Allg. Lit. Zeitung*, vol. 1, no. 68, pp. 0281–0284, 1842.
- [47] Wang Q *et al.*, "UCN-01: A Potent Abrogator of G2 Checkpoint Function in Cancer Cells With Disrupted p53 - PubMed," *J Natl Cancer Inst.*, 1996. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8667426/>. [Accessed: 05-Jul-2020].
- [201] Wang Y. and N. Tjandra, "Structural insights of tBid, the caspase-8-activated bid, and its BH 3 domain," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 50, pp. 35840–35851, Dec. 2013.
- [139] Wermer P., "Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands," *Am. J. Med.*, vol. 16, no. 3, pp. 363–371, 1954.
- [173] Wesselborg S. and K. Lauber, "Mechanisms of anticancer drug action," in *Apoptotic Pathways as Targets for Novel Therapies in Cancer and Other Diseases*, G. S. Los M, Ed. Springer US, 2005, pp. 31–55.
- [1] Williams A.B. and Schumacher B., "p53 in the DNA-damage-repair process," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 6, no. 5, May 2016.
- [26] Wong C., E. Vosburgh, A. J. Levine, L. Cong, and E. Y. Xu, "Human neuroendocrine tumor cell lines as a three-dimensional model for the study of human neuroendocrine tumor therapy," *J. Vis. Exp.*, no. 66, pp. 1–7, Aug. 2012.
- [183] Wu T. and X. Hua, "Menin represses tumorigenesis via repressing cell proliferation.," *Am. J. Cancer Res.*, vol. 1, no. 6, pp. 726–39, 2011.
- [202] Wu Y. *et al.*, "Interplay between menin and K-Ras in regulating lung adenocarcinoma," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 47, pp. 40003–40011, Nov. 2012.
- [203] Wu Y. *et al.*, "RSUME is implicated in tumorigenesis and metastasis of pancreatic neuroendocrine tumors," *Oncotarget*, vol. 7, no. 36, pp. 57878–57893, 2016.
- [206] Wu Y.-J., "New Indole-Containing Medicinal Compounds," in *Heterocyclic Scaffolds II: reactions and Applications of Indoles*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2010, pp. 1–29.
- [87] Xu J., "Preparation, Culture, and Immortalization of Mouse Embryonic Fibroblasts," in *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. Chapter 28, John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- [204] Yang Y. *et al.*, "Acetylation of FoxO1 activates b i m expression to induce apoptosis in response to Histone deacetylase inhibitor depsipeptide treatment12 www.neoplasia.com," *Neoplasia*, vol. 11, no. 4, pp. 313–324, 2009.
- [22] Yates C. J., P. J. Newey, and R. V. Thakker, "Challenges and controversies in management of pancreatic neuroendocrine tumours in patients with MEN1," *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, vol. 3, no. 11, Lancet Publishing Group, pp. 895–905, 01-Nov-2015.
- [197] Yuan X., C. Larsson, and D. Xu, "Mechanisms underlying the activation of TERT transcription and telomerase activity in human cancer: old actors and new players," *Oncogene*, vol. 38, no. 34, Nature Publishing Group, pp. 6172–6183, 22-Aug-2019.
- [210] Zellseneszenz - Google Suche. [Online]. Available: <https://www.google.com/search?q=Zellseneszenz&oq=Zellseneszenz&aqs=chrome..69i57j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8>. [Accessed: 08-Nov-2020].

- Zhan J. *et al.*, "Negative Regulation of ASK1 by p21Cip1 Involves a Small Domain That Includes Serine 98 That Is Phosphorylated by ASK1 In Vivo," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 9, pp. 3530–3541, May 2007.
- [89] Zhang H. P. XD, Gillespie SK, "Staurosporine Induces Apoptosis of Melanoma by Both Caspase-Dependent and -Independent Apoptotic Pathways - PubMed," *Mol Cancer Ther.*, 2004. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14985459/>. [Accessed: 05-Jul-2020].
- Zhang J., R. Francois, R. Iyer, M. Seshadri, M. Zajac-Kaye, and S. N. Hochwald, "Current understanding of the molecular biology of pancreatic neuroendocrine tumors," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 105, no. 14. J Natl Cancer Inst, pp. 1005–1017, 17-Jul-2013.
- [90] Zhang S. Q., A. Kovalenko, G. Cantarella, and D. Wallach, "Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKK γ) upon receptor stimulation," *Immunity*, vol. 12, no. 3, pp. 301–311, 2000.
- [168] Zhang S. Q., A. Kovalenko, G. Cantarella, and D. Wallach, "Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKK γ) upon receptor stimulation," *Immunity*, vol. 12, no. 3, pp. 301–311, 2000.
- [169] Zhang Y., X. Chen, C. Gueydan, and J. Han, "Plasma membrane changes during programmed cell deaths," *Cell Research*, vol. 28, no. 1. Nature Publishing Group, pp. 9–21, 01-Jan-2018.
- [205] Zimmermann A., B. Gloor, A. Kappeler, W. Uhl, H. Friess, and M. W. B  chler, "Pancreatic stellate cells contribute to regeneration early after acute necrotising pancreatitis in humans," *Gut*, vol. 51, no. 4, pp. 574–578, Oct. 2002.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: In A) Aufbau der in dieser Arbeit verwendeten inaktiven Procaspase 8 und deren Spaltung zur aktiven Caspase 8. Diese fungiert als Initiatorcaspase [53].10

Abbildung 2: In B) Aufbau der in dieser Arbeit verwendeten inaktiven Procaspase-3 und -7, die nach erfolgter Spaltung als Effektorcaspasen fungieren [53].10

Abbildung 3: Zwei Wege führen zur Apoptose. Der Extrinsische Signalweg kann durch Staurosporin und durch den Rezeptor-Liganden Komplex in Form von TRAIL am TRAIL-Rezeptor, Fas am Fas-Rezeptor oder TNF am TNF-Rezeptor ausgelöst. Die Initiatorcaspasen 2, 8, 9 u. 10 aktivieren die Effektorcaspasen 3, 6 u. 7 der gemeinsamen Endstrecke. Der Intrinsische Signalweg kann durch DNA-Schäden oder Entzug von Wachstumssignalen ausgelöst werden. Bax, Bad und Bak bewirken die mitochondriale Cytochrom-c Freisetzung. Das Apoptosom, bestehend aus Cytochrom-C und APAF-1, aktiviert die Initiator-Pro-Caspase 9, welche die Effektorcaspasen 3, 6 u. 7 der gemeinsamen Endstrecke aktiviert [67].....12

Abbildung 4: Wildtyp Menin initiiert die Phosphorylierung und Acetylierung von TP53, welches durch Aktivierung von p21 entweder Zellzyklusarrest in der G1/S-Phase, DNA-Reparatur, Zellüberleben oder Apoptose bewirkt [79]. Apoptose wird durch TP53 mitochondrial (intrinsisch) durch Rekrutierung von Pro-Caspase 9 eingeleitet [126]. Caspase 9 aktiviert Caspase 3, welche die Apoptose auslöst [209]. Ein knockout Menins geht mit einer Apoptosereduktion einher [94].....13

Abbildung 5: Menin aktiviert die Caspase 3-Aktivität durch den Transkriptionsfaktor FOXO1, der proapoptotische Bcl-Proteine aus dem Mitochondrium freilässt. Dies bewirkt eine hohe Caspase 3-Aktivität. Durch wechselseitige Gentranskription werden hohe Level an FOXO1 und Menin aufrecht

erhalten. Zusätzlich bewahrt Menin FOXO1 vor dem Abbau durch Ubiquitinierung und Akt-initiierte Phosphorylierung [91].14

Abbildung 6: Produktangaben zur verwendeten Hs_MEN1_2 FlexiTube siRNA GeneSolution GS4221 for MEN1 des Herstellers Qiagen [210].....30

Abbildung 7: Schritte der RNA-Extraktion33

Abbildung 8: Real Time qPCR in BON1 Zellen zur Auswertung der relativen Genexpression des MEN1-, CDKN1A- (p21) und TP53-Gens nach 24- und 48-stündiger Inkubation mit bzw. ohne Staurosporin. Die Genexpressionen wurden jeweils auf GAPDH (relative Genexpression) der MEN1-Wildtyp Probe (NTC= no template control) normalisiert. Der MEN1 Knockdown erfolgte mit MEN1-siRNA. Die Balken zeigen die normalisierten Cq Werte \pm SEM. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p < 0,05$).40

Abbildung 9: Real Time qPCR in BON1 Zellen zur Auswertung der relativen Genexpression des MEN1-, CDKN1A- (p21) und TP53-Gens nach 24- und 48-stündiger Inkubation mit bzw. ohne Staurosporin. Die Genexpressionen wurden jeweils auf GAPDH (relative Genexpression) der MEN1-Wildtyp Probe (NTC= no template control) normalisiert. Der MEN1 Knockdown erfolgte mit MEN1-siRNA. Die Balken zeigen die normalisierten Cq Werte \pm SEM. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p < 0,05$).42

Abbildung 10: Real Time qPCR in BON1 Zellen zur Auswertung der relativen Genexpression des MEN1-, CDKN1A- (p21) und TP53-Gens nach 24- und 48-stündiger Inkubation mit bzw. ohne Staurosporin. Die Genexpressionen wurden jeweils auf GAPDH (relative Genexpression) der MEN1-Wildtyp Probe (NTC= no template control) normalisiert. Der MEN1 Knockdown erfolgte mit MEN1-siRNA. Die Balken zeigen die normalisierten Cq Werte \pm SEM. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p < 0,05$).44

Abbildung 11: Messung der Caspase-8 Aktivität in MEF-MEN1-Wildtyp u. MEF-MEN1-Knockout-Zellen nach 18h Inkubation mit 1 μ M Staurosporin, zVAD und 1 μ M Staurosporin+zVAD. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p < 0,05$). Symbol # bedeutet signifikanter Unterschied zwischen MEN1-WT u. MEN1-KO. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung der Werte.....46

Abbildung 12: Messung der Caspase-3/7 Aktivität in MEF-MEN1-Wildtyp u. MEF-MEN1-Knockout-Zellen nach 18h Inkubation mit 1 μ M Staurosporin, zVAD und 1 μ M Staurosporin+zVAD. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p < 0,05$). Symbol # bedeutet signifikanter Unterschied zwischen MEN1-WT u. MEN1-KO. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung der Werte.....47

Abbildung 13: Messung der Caspase-8 Aktivität in MEF-MEN1-Wildtyp u. MEF-MEN1-Knockout-Zellen nach 18h Inkubation mit 1 μ M Staurosporin, zVAD und 1 μ M Staurosporin+zVAD. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p < 0,05$). Symbol # bedeutet signifikanter Unterschied zwischen MEN1-WT u. MEN1-KO. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung der Werte.....49

Abbildung 14: Messung der Caspase-3/7 Aktivität in MEF-MEN1-Wildtyp u. MEF-MEN1-Knockout-Zellen nach 18h Inkubation mit 1 μ M Staurosporin, zVAD und 1 μ M Staurosporin+zVAD. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p < 0,05$). Symbol # bedeutet signifikanter Unterschied zwischen MEN1-WT u. MEN1-KO. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung der Werte.....49

Abbildung 15: Messung der Caspase-8 Aktivität in MEF-MEN1-Wildtyp u. MEF-MEN1-Knockout-Zellen nach 18h Inkubation mit 1 μ M Staurosporin, zVAD und 1 μ M Staurosporin+zVAD. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p < 0,05$). Symbol # bedeutet signifikanter Unterschied zwischen MEN1-WT u. MEN1-KO. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung der Werte.....51

Abbildung 16: Messung der Caspase-3/7 Aktivität in MEF-MEN1-Wildtyp u. MEF-MEN1-Knockout-Zellen nach 18h Inkubation mit 1 μ M Staurosporin, zVAD und 1 μ M Staurosporin+zVAD. Symbol * bedeutet

signifikante Werte ($p = < 0,05$). Symbol # bedeutet signifikanter Unterschied zwischen MEN1-WT u. MEN1-KO. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung der Werte.....51

Abbildung 17: Messung der Caspase-8 Aktivität in MEF-MEN1-Wildtyp u. MEF-MEN1-Knockout-Zellen nach 18h Inkubation mit 1 μ M Staurosporin, zVAD und 1 μ M Staurosporin+zVAD. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p = < 0,05$). Symbol # bedeutet signifikanter Unterschied zwischen MEN1-WT u. MEN1-KO. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung der Werte.....53

Abbildung 18: Messung der Caspase-3/7 Aktivität in MEF-MEN1-Wildtyp u. MEF-MEN1-Knockout-Zellen nach 18h Inkubation mit 1 μ M Staurosporin, zVAD und 1 μ M Staurosporin+zVAD. Symbol * bedeutet signifikante Werte ($p = < 0,05$). Symbol # bedeutet signifikanter Unterschied zwischen MEN1-WT u. MEN1-KO. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung der Werte.....53

Abbildung 19: 500 MEF MEN1 Knockout Zellen 24h Inkubation.....	54
Abbildung 20: 500 MEF MEN1-WT Zellen 24h.....	54
Abbildung 21: 1.000 MEF MEN1 Knockout 48h Inkubation	54
Abbildung 22: 1.000 MEF MEN1 Wildtyp 48h Inkubation	54
Abbildung 23: 7.000 MEF MEN1-KO Zellen 48h Inkubation.....	55
Abbildung 24: 7.000 MEF MEN1-Wildtyp 48h Inkubation	55
Abbildung 25: 10.000 MEF MEN1 Knockout 72h Inkubation	55
Abbildung 26: 10.000 MEF MEN1-Wildtyp 72h Inkubation	55
Abbildung 27: Sphäroiddurchmesser in μ m von MEF-MEN1 Knockout (KO) und MEF-MEN1-Wildtyp (WT) Zellen im Beobachtungszeitraum von 24h bis 96h. Die x-Achse repräsentiert den Beobachtungszeitraum in Stunden (h), die y-Achse stellt den gemittelten Sphäroiddurchmesser in μ m dar. Die farbigen Graphen verdeutlichen die Anzahl der verwendeten Zellen pro Sphäroid. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Werte.	57
Abbildung 28: 1.000 MEF MEN1 Knockout Zellen 24h	58
Abbildung 29: 1.000 MEF MEN1 Wildtyp Zellen 24h.....	58
Abbildung 30: 1.000 MEF MEN1 Knockout 48h Inkubation	59
Abbildung 31: 1.000 MEF MEN1 Wildtyp 48h Inkubation	59
Abbildung 32: 1.000 MEF MEN1 Knockout Zellen 72h Inkubation.....	59
Abbildung 33: 1.000 MEF MEN1 Wildtyp Zellen 72h Inkubation	59
Abbildung 34: 1.000 MEF MEN1 Knockout Zellen 96h Inkubation.....	60
Abbildung 35: 1.000 MEF MEN1 Wildtyp Zellen 96h Inkubation	60
Abbildung 36: Sphäroiddurchmesser in μ m von MEF-MEN1 Knockout (KO) und MEF-MEN1-Wildtyp (WT) Zellen im Beobachtungszeitraum von 24h bis 96h. Die x-Achse repräsentiert den Beobachtungszeitraum in Stunden (h), die y-Achse stellt den gemittelten Sphäroiddurchmesser in μ m dar. Die farbigen Graphen verdeutlichen die Anzahl der verwendeten Zellen pro Sphäroid.	61

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	21
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 3: Gebrauchsfertige Kits	23
Tabelle 4: Medien, Seren, Lösungen, Reagenzien	23
Tabelle 5: Chemikalien und Arzneimittel.....	24
Tabelle 6: PCR-Primer	24
Tabelle 7: Datenanalyse.....	25
Tabelle 8: Zelllinie/Nährmedien/Zusätze	26
Tabelle 9: Zellanzahl/Zelllinie der 3D-Sphäroid-Kulturen.....	36

9 Formelverzeichnis

Formel 1: $1000 \text{ ng} \times \text{ng}/\mu\text{l} = \text{Wert} \times \mu\text{l erwünschte cDNA (ng), dividiert durch RNA-Konz. (ng}/\mu\text{l)} = \text{---}\mu\text{l}$
 RNA Fehler! Textmarke nicht definiert.
 Formel 2: $(2 \text{ Replikate}) \times (200\mu\text{l Working Reagent A+B}) \times (7 \text{ Standards+ var. Proben}) = \text{Totalvolumen des benötigten Working Reagent.}$ Fehler! Textmarke nicht definiert.

10 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	ausgeschriebene Variante
18F-FDG PET	Fluodeoxyglucose- ¹⁸ F -Positronenemissionstomografie
5-HT	5-Hydroxytryptamin
68-Gallium SRS	68-Gallium Somatostatin-Rezeptor-Szintigrafie
Abb.	Abbildung
Akt	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
AllStars	Negative Control siRNA
ALOX5	Arachidonat-5-Lipoxygenase
ALT	alternative lengthening telomerase
AML	Akute Myeloische Leukämie
Apaf	Apoptosis associated factor1
AR	Androgenrezeptor
ASK	Apoptosis signal-regulating kinase
ATR	ATM and Rad3-related protein kinase
ATRX	Alpha-thalassemia X-lined Mental Retardation Protein
Bax	Bcl-2-associated X protein, proapoptotisches Protein
Bcl	B-cell leukemia 2, anti-oder proapoptotisches Protein
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BRCA2	Breast cancer growth suppressor protein
c-Myc	Myelocytomatosis oncogene cellular homolog
c-Myb	Avian myeloblastosis virus oncogene cellular homolog
CARD	Caspase-Rekrutierungsdomäne
Caspase	Cystein-aspartat specific protease
CDC 7	Cell division cycle 7-related protein kinase
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
CDKI	Cyclin-abhängige Kinaseninhibitor
CDKN1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A

CDKN1B	Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor 1B
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	Complementary DNA
cFLIP	zelluläres FLICE-inhibitory-Protein
CHEK2	Checkpoint kinase 2
CHES1	Checkpoint suppressor 1
CHK1	Checkpoint kinase
CO2	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CpG	Nukleotidabfolge: Cytosin-Guanin
CREB	cAMP response element-binding protein
CT	Computertomographie
Ct-Punkt	cycle threshold für Schwellenwert-Zyklus
DAXX	Death-associated protein 6
DAXX	Death associated protein 6
DED	Death effector domain; Todeseffektordomäne
DEK	Dosiseffektkurve
DISC	Death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA	deoxyribonucleic acid
DNMT1	DNA-Methyltransferase 1
DOTATATE-PET/CT	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10- Tetraessigsäure-[Tyr3]Octreotat Positronen-Emissions-Tomographie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ENET	European Neuroendocrine Tumour Society
ER-alpha	Östrogen-Rezeptor Alpha
EZM	Extrazellulärmatrix
FADD	Fas-associated protein with death domain
FANCD2	Fanconi anemia complementation group D2
Fas (CD95/APO1)	Apoptosis-mediating surface antigen FAS
FBP1	Far upstream element FUSE binding protein
FBS	Fetal bovine serum

FGF2	Fibroblast Growth Factor
FLIP	Fllice inhibitory protein
FOXA2	Forkhead protein 2
FOXO1	Forkhead-Box-Protein 1
G1-3	Gap (engl. Lücke)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gas 1	Growth arrest specific
Gen.	genetisch
GEP-NET	Gastroenteropankreatische Neuroendokrine Tumoren
GERD	Gastroösophageale Refluxkrankheit
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GLP1	Glucagon-like Peptid 1
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
H3/4	Histon 3/4
HDAC	Histone deacetylase
HPSC 2.2	Human Pancreatic Stellate Cells
Hsp 90	heat shock protein 90
hTERT	Human Telomerase reverse transcriptase
hTERT	Human Telomerase reverse transcriptase
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
INS-1	Rat Insulinoma Cell Line
JAK-STAT	Januskinase- signal transducer and activator of transcription
JNK	C-Jun-N-terminale Kinasen
K-Ras	kirsten rat sarcoma
kDA	Kilodalton
Ki-67	Antigen KI-67
KO	Knockout
Lap.	laparoskopisch
LEDGF	Lens epithelium-derived growth factor
LXR-alpha	Liver X receptor alpha
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEF	mouse embryo fibroblast cells

MEN1	Multiple endokrine. Neoplasie
microRNA	kurze regulatorische RNA
MLL	Mixed lineage leukemia
MME-Promotor	Membran-Metallo-Endopeptidase
MML	Moloney murine leukemia
MNX1	Motor neuron and pancreas homebox 1
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomografie
mSIN3A	Transcription regulator family member A
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MUTYH	mutY DNA glycosylase
Myc	Myelocytomatosis oncogene cellular homolog
NANET	North American Neuroendocrine Tumor Society
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NET	Neuroendokrine Tumoren
NF-κB	Nuclear factor κ B
NGF	Nerve Growth Factor
Noxa	Damage protein, a pro-apoptotic BH3-containing protein
NP-40	Tergitol
NSE	Neuronenspezifische Enolase
NTC	No template control
P21	CDK-Inhibitor 1
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
pH	Lat. potentia Hydrogenii
PI3	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKC	Proteinkinase-C
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PNEC	Pankreatisches neuroendokrines Karzinom
pNEN	pankreatische neuroendokrine Neoplasien
PPAR-alpha	Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptor γ
PPom	Pancreatic polypeptide produzierender Tumor
PRMT5	engl. "protein-arginine-methyl-transferase 5"
PRO	Pro-Domäne

PROMID	Placebo- controlled, Double-Blind, Prospective, Randomized study of the Effect of Octreotide LAR in the Control of Tumor Growth in Patients with Metastatic Neuroendo- crine MIDgut Tumors
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
PTPase	Guanosintriphosphat-aktivierende Proteine
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF Membrane	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RAS	Rat sarcoma
Ras Raf Mek Erk	Map Kinase Weg
RASSF1A	Ras association domain-containing protein 1
Rho-Kinase	Rho-associated protein kinase (ROCK)
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid
RPA2	Replikationsprotein 2
RPMI	Roswell park memorial institute
RTCA	Radio Technical Commission for Aeronautics
RUNX2	RUNT-related transkription factor 1
SCF-Skp	Skp-cdc53-F-box ubiquitin ligase complex
SETD2	SET Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferase
siRNA	small interfering DNA
Sirt1	Silent information regulator 1
SMAD	Small body size mothers against decapentaplegic
SOS	Sons of sevenless
Sox9	Sry-box transcription factors
Src-Kinase	Rous sarcoma oncogene cellular homolog
β-Cat	β-Catenin
SST	Somatostatinrezeptor
SYBR Green	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1 <i>H</i> -chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
TAK1	TGF β-activated kinase 1
TBS-Tabletten	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TCF3	T cell factor 3

TGF β	Transforming growth factor
TNF-alpha	Tumor necrosis factor
TNF-R1	Tumornekrosefaktor Rezeptor Typ 1
TNM	Primärtumor (T), Lymphknotenbefall (N), Metastasen (M)
TP53	Tumorsuppressorprotein 53
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRPV1	transient receptor potential channels
UNC-01	7 hydroxy-staurosporine
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor
VIPom	Werner-Morrison Syndrom
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WIP1	wildtype p53-induced protein-1
Wnt	Acronym aus "Wingless" und "Int-1"
WT	Wildtyp
Z-VAD-FMK	carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone
ZES	Zollinger Ellison Syndrom

11 Anhang

11.1 Danksagung

Mein allerherzlichsten Dank an Herrn Prof. Dr. Buchholz für das Ermöglichen der Promotion.

Prof. Dr. Buchholz, der immer Zeit fand, mich im theoretischen Teil der Dissertation großartig zu unterstützen.

Dies gilt ebenso für die stets hilfsbereiten Mitarbeiter des VTG-Labors: Frau Dr. rer. nat. Emily Slater, Norman Gercke, Frau Carmen Bollmann, Frau Elvira Matthäi und Frau Silvia Roth.